

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGÍA



# Efectos clínicos del suero autólogo y de sangre de cordón en el ojo seco

MEMORIA PARA ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:  
MARINA RODRÍGUEZ CALVO DE MORA

DIRECTORES: PROF. D. ANTONIO MORENO GUERRERO  
DR. D. ISIDRO PRAT ARROJO



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Marina Rodríguez Calvo de Mora

 <http://orcid.org/0000-0002-5513-8790>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)

# Agradecimientos

A los doctores Moreno Guerrero y Prat Arrojo por su respaldo y apoyo incondicional.

A los doctores Fernández-Baca Casares y Villalvilla Castillo, jefes pasado y presente del Servicio de Oftalmología del Hospital Regional de Málaga, por animarme a perseverar.

Al Dr. Rodríguez Moreno por su ayuda inestimable en las tareas logísticas, y sobre todo, por su apoyo y cariño constantes mientras elaboraba este trabajo. A los Dres. Domínguez Ruiz y Barrero Sojo por su asistencia en la revisión de los pacientes. Y en general, a todos mis compañeros del Servicio de Oftalmología, sin los que hubiera sido mucho más complicado elaborar el presente trabajo.

A los miembros del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Málaga, en especial a la Dra. Hernández Lamas y la Dra. Antúnez Rodríguez por profesionalidad y su buen hacer.

A la Fundación Pública Andaluza para la Investigación de Málaga en Biomedicina y Salud (FIMABIS), en especial a la Sra. Patricia Vergara por la colaboración en la consecución de este ensayo clínico y a la Sra. Rita González, por el análisis estadístico.

A todos los miembros del *Netherlands Institute for Innovative Ocular Surgery* (NIIOS) de Rotterdam, por hacer los ocho meses de aprendizaje intensivo en investigación clínica un periodo satisfactorio y fértil.

Al Dr. Juan Domínguez Martínez, profesor titular de la Universidad de Málaga en el departamento de Estadística, por el desinteresado y complicadísimo cálculo del número muestral.

A la Asociación de Síndrome de Sjögren por incluirme en sus actividades divulgativas y colaborar en el reclutamiento de pacientes.

Y, por supuesto, a los pacientes, sin los que este trabajo no sería posible ni tendría sentido.



El trabajo de investigación aquí presentado ha sido financiado a través de una beca concedida por el Ministerio de Sanidad en el marco de las Ayudas para la Investigación Clínica Independiente de 2011 (EC11-506), cuyo promotor es la Fundación Pública Andaluza para la Investigación de Málaga en Biomedicina y Salud (FIMABIS).



# Índice

# Índice

1. Importancia y justificación del trabajo.....	15-21
1.1. Contexto.....	15
1.2. Antecedentes.....	15
1.3. Justificación del estudio.....	18
1.4. Hipótesis.....	19
1.4.1. Hipótesis específicas.....	19
1.4.2. Preguntas de investigación.....	19
1.5. Objetivos.....	19-20
1.5.1. General.....	19
1.5.2. Específicos.....	19
1.6. Síntesis y <i>abstract</i> .....	20-21
2. Introducción.....	23-86
2.1. Breve repaso histórico.....	23-26
2.1.1. Periodo hipocrático.....	23
2.1.2. Periodo sjögrénico.....	24
2.1.3. Descubrimiento del ojo seco leve.....	25
2.2. La superficie ocular y la película lagrimal.....	26-40
2.2.1. Recuerdo anatómico y fisiológico.....	26-33
2.2.1.A. Anejos oculares.....	27
2.2.1.B. Glándulas lagrimales.....	27
2.2.1.C. Conjuntiva.....	27
2.2.1.D. Limbo.....	29
2.2.1.E. Córnea.....	29
2.2.2. La secreción lagrimal.....	33-38
2.2.2.A. Funciones.....	33
2.2.2.B. Componentes.....	34
2.2.2.C. Propiedades físico-químicas.....	36
2.2.2.D. Estructura.....	36



2.2.3. La unidad funcional lagrimal.....	38-40
2.2.3.A. Funciones.....	38
2.2.3.B. Componentes.....	39
2.2.3.C. Aparato y secreción lagrimal.....	39
2.2.3.D. Inervación y mecanismo de lagrimación.....	40
2.3. Síndrome de ojo seco.....	40-53
2.3.1. Introducción.....	40
2.3.2. Epidemiología del ojo seco.....	41
2.3.3. Clasificación del ojo seco.....	42-52
2.3.3.A. Clasificación etiológica del ojo seco.....	42
2.3.3.B. Clasificación fisiopatológica.....	45-48
2.3.3.B.1. Ojo seco acuico-deficiente.....	45
2.3.3.B.2. Ojo seco evaporativo.....	48
2.3.3.C. Fisiopatología del síndrome de ojo seco.....	49
2.3.3.D. Clasificación según estadio de gravedad.....	51
2.4. Impacto del ojo seco .....	53
2.5. Diagnóstico del ojo seco.....	53-63
2.5.1 Pruebas complementarias.....	54-63
2.5.1.A. Tiempo de rotura lagrimal.....	54
2.5.1.B. Test de Schirmer.....	55
2.5.1.C. Tinción córneo-conjuntival .....	55
2.5.1.D. Citología de impresión conjuntival.....	58
2.5.1.E. Otros métodos diagnósticos .....	60
2.5.2. Síntomas clínicos de ojo seco .....	62
2.5.3. Cuestionarios.....	63
2.6. Tratamiento del ojo seco.....	64-71
2.6.1. Ojo seco grado 1.....	64
2.6.2. Ojo seco grado 2.....	67
2.6.3. Ojo seco grado 3.....	70
2.6.4. Ojo seco grado 4.....	70
2.7. Antecedentes y estado actual del tema de estudio.....	71-84
2.7.1. Suero autólogo.....	71-81
2.7.1.A. Efectos biológicos .....	76
2.7.1.B. Efectos sobre el ojo seco .....	78

2.7.1.C. Otras aplicaciones .....	79
2.7.1.D. Tolerancia y efectos secundarios.....	79
2.7.1.E. Preparación.....	80
2.7.1.F. Legislación vigente .....	80
2.7.2. Suero heterólogo de sangre periférica.....	82
2.7.2.A. Propiedades.....	82
2.7.2.B. Preparación.....	82
2.7.2.C. Comparación con suero autólogo.....	82
2.7.3. Suero de sangre de cordón umbilical.....	82-83
2.7.3.A. Propiedades.....	82
2.7.3.B. Comparación entre SCU y SA.....	83
2.7.3.C. Comparación entre SCU y SH.....	84
2.7.3.C. Preparación del colirio de SCU.....	84
3.7.4. Derivados hemáticos plaquetarios.....	86
3. Material y métodos.....	88-95
3.1. Universo y muestra.....	88-89
3.1.1. Universo y muestra.....	88
3.1.2. Criterios de inclusión.....	88
3.1.3. Criterios de exclusión.....	89
3.2. Metodología.....	89-94
3.2.1. Justificación del tamaño muestral.....	90
3.2.2. Recogida de datos.....	91
3.2.3. Determinaciones.....	92
3.2.3.A. Agentes transmisibles.....	92
3.2.3.B. Grupos ABO/ RH y AAIL.....	93
3.2.3.C. Moléculas.....	94
3.2.4. Variables.....	94-95
3.2.4.A. Variable primaria.....	94
3.2.4.B. Variables secundarias.....	95
3.3. Métodos de recolección de la información.....	95
4. Resultados.....	97-120
4.1. Datos demográficos.....	97

4.2. Respuesta al tratamiento con los distintos sueros.....	99
4.2.1. Análisis en dos grupos independientes.....	100
4.2.2. Análisis variación tercera-primer visita.....	100
4.2.3. Análisis ANOVA de medidas repetidas.....	101
4.2.3.A. Test de Schirmer.....	101
4.2.3.B. BUT.....	102
4.2.3.C. Tinción con fluoresceína.....	102
4.2.3.D. Tinción con verde de lisamina.....	102
4.2.3.E. Cuestionario.....	103
4.2.4. Análisis de los indicadores de mejoría.....	103
4.3. Comparación respuesta al tratamiento SA y SCU.....	105-120
4.3.1. Test de Schirmer.....	105
4.3.2. BUT.....	105
4.3.3. Tinción con fluoresceína.....	106
4.3.4. Tinción con verde de lisamina.....	107
4.3.5. Cuestionario.....	107
4.4. Comparación pacientes con tratamiento previo.....	108
4.5. Comparación en pacientes con enfermedades autoinmunes.....	110
4.6. Comparación de la concentración de las moléculas.....	113
4.7. Valores de las moléculas.....	115
5. Discusión.....	122-132
5.1. Datos demográficos.....	122
5.2. Respuesta al tratamiento del ojo seco.....	123
5.3. Comparación del efecto de SA y SCU.....	124
5.4. Pacientes con tratamiento previo.....	125
5.5. Pacientes con enfermedad autoinmune.....	125
5.6. Concentración de moléculas.....	126
5.7. Particularidades del SCU en nuestro centro.....	129-130
5.7.1. Tiempo de procesamiento.....	129
5.7.2. Rentabilidad del colirio de SCU.....	129
5.8. Limitaciones del estudio.....	130-132
5.8.1. Cálculo del número muestral.....	130

5.8.2. Reclutamiento de pacientes.....	130
5.8.3. Ausencia de grupo control.....	131
5.8.4. Sesgos.....	131
5.8.4.A. Sesgo de selección.....	131
5.8.4.B. Sesgo de medida.....	132
5.8.4.C. Efecto Hawthorne.....	132
5.8.5. Test empleados.....	132

## 5. Discussion

5.1. Demographic data.....	133
5.2. Response to the treatment.....	134
5.3. Comparison between AS and UCS eye drops.....	135
5.4. Patients with previous treatment.....	135
5.5. Patients with autoimmune disease.....	136
5.6. Concentration of molecules.....	137
5.7. Particularities of the UCS processing in our centre.....	139-140
5.7.1. Processing of the UCS samples.....	139
5.7.2. Effectiveness of the UCS eye drops.....	140
5.8. Limitations of the study.....	140-142
5.8.1. Sample size calculation.....	140
5.8.2. Patient enrollment.....	140
5.8.3. Control group absence.....	141
5.8.4. Biases.....	141
5.8.4.A. Bias of selection.....	141
5.8.4.B. Bias of measurement.....	142
5.8.4.C. Hawthorne effect.....	142
5.8.5. Performed tests.....	142
6. Conclusiones.....	144-145
6. Conclusions.....	146-147
7. Abreviaturas.....	149

8. Bibliografía.....	151-159
9. Anexo.....	161-164
10. Resumen en inglés – <i>English summary</i> .....	165-178

# Importancia y justificación del trabajo

# 1. Importancia y justificación del trabajo

## 1.1. Contexto

El síndrome de ojo seco (SOS) es un problema de salud muy prevalente cuyo tratamiento resulta en la actualidad generalmente insatisfactorio. Aunque normalmente presenta síntomas leves o moderados y un curso típicamente crónico y progresivo, puede desarrollar alteraciones y secuelas graves. Afecta la calidad de vida de los pacientes dificultando las tareas cotidianas no necesariamente relacionadas con la visión, alterando el comportamiento social y la percepción que tiene el paciente de su propia salud (1). De hecho, se ha calculado que un SOS moderado afecta la calidad de vida como la psoriasis y, en grado grave, como una angina de pecho grado III (2). Asimismo, supone un problema económico importante en los países desarrollados (3).

## 1.2. Antecedentes

Mucho se ha avanzado en los últimos años en el terreno de la fisiopatología y el tratamiento del ojo seco. Sin embargo, los resultados terapéuticos actuales pueden resultar frustrantes, al tratarse de una patología crónica sin tratamiento etiológico específico. Así, el objetivo clínico se estructura en torno al control de los síntomas y la prevención del daño de la superficie ocular.

Los tratamientos convencionales incluyen modificaciones ambientales, consejo sobre uso de lentes de contacto y cirugía refractiva, así como empleo de sustitutos lagrimales (lágrimas artificiales), ungüentos, corticosteroides tópicos y/o sistémicos, antibióticos como las tetraciclinas o inmunomoduladores como la ciclosporina A. En casos muy graves pueden emplearse técnicas quirúrgicas

(tapones lagrimales, tarsorrafia, trasplante de membrana amniótica, trasplante de glándulas salivares...). A pesar del tratamiento, muchos pacientes siguen presentando signos y síntomas de ojo seco. El uso de sustancias que aporten no sólo hidratación sino nutrición y factores de crecimiento constituye una alternativa esperanzadora.

Los efectos terapéuticos de la aplicación del colirio suero autólogo (SA) a pacientes se conocen desde 1984 gracias a los trabajos de Fox (4), que describió su experiencia en enfermos con queratoconjuntivitis. A pesar de ello, el pobre conocimiento de su mecanismo de acción a nivel de la superficie ocular, hizo que su utilización fuese escasa hasta finales de los años 90 gracias a los trabajos de Tsubota (5).

El mecanismo de acción del SA se basa principalmente en su propiedad lubricante, pero lo que lo hace especialmente interesante es su concentración en vitaminas A y E, factores de crecimiento y fibronectina (6,7), que promueven el trofismo celular del epitelio corneal interviniendo en su regeneración (5,8).

El SA presenta pH y osmolaridad similares a la lágrima y, además, cuenta con componentes de acción epiteliotrófica en concentraciones superiores a la misma. Gracias a estas propiedades podemos afirmar que el SA no sólo actúa humidificando la superficie sino que además aporta factores nutricionales y de crecimiento necesarios para mantener la viabilidad celular en los procesos de reparación epitelial. Se piensa que estos factores son los responsables de los efectos terapéuticos observados. Posee asimismo componentes bactericidas, disminuyendo el riesgo de contaminación e infección.

En los últimos años, el empleo del SA se ha ido extendiendo debido al aumento de patologías susceptibles de su indicación, así como la disponibilidad de bancos de tejidos dotados de la infraestructura necesaria para su preparación dentro de un sistema de calidad implantado. Así, el SA constituye hoy día una alternativa terapéutica eficaz para el tratamiento de las enfermedades de la superficie ocular no respondedoras a tratamiento convencional (9,10,11), empleándose con éxito en numerosas patologías además del ojo seco: Defectos epiteliales persistentes (12), erosiones recurrentes (13,14,15), úlceras neurotróficas (16), Enfermedad Injerto Contra Huésped (17), queratopatía anirídica (18), queratoconjuntivitis límbica superior (19), cirugía vítreo-retiniana de agujeros maculares (20,21,22), etc.



Noble (23) describe en sus estudios que el SA es superior a la terapia convencional para el tratamiento de las patologías de la superficie ocular. El Subcomité para el Manejo y Tratamiento de Ojo Seco del Taller Internacional de Ojo Seco (24), lo incluye entre las terapias recomendadas para el estadio moderado-grave o no respondedor a terapia convencional.

En el servicio de Oftalmología del Hospital Regional Universitario de Málaga se está indicando el empleo de SA desde el año 1999, elaborado por el Banco Sectorial de Tejidos. Desde el año 2013, se ha tratado a más de 1.600 pacientes con diversas patologías oftalmológicas, siendo la más frecuente el SOS.

Entre los inconvenientes de la aplicación del SA se encuentran la frecuencia en el número de extracciones de sangre y la posibilidad de que el paciente padezca una enfermedad infecciosa, con la consiguiente posibilidad de contagio. Hay enfermos que no son candidatos a la extracción periódica de sangre: insuficiencia cardíaca, mal estado general, anemia, discrasias sanguíneas, niños, pacientes psiquiátricos, tratamiento quimioterápico y padecimiento de enfermedades autoinmunes que puedan alterar la calidad y eficacia del suero. Los enfermos diabéticos, con enfermedades autoinmunes, colagenosis y aquellos con infección activa por VHC y VIH, presentan, con frecuencia, signos y síntomas de ojo seco severo, cuya respuesta al tratamiento convencional suele ser pobre. Las características del colirio de suero heterólogo (SH) no difieren del autólogo y pueden resultar beneficiosas en aquellos enfermos que presenten ciertas limitaciones en la extracción de su propio suero.

Desde el comienzo del empleo de SA en el Hospital Regional Universitario de Málaga, se ha aplicado también SH a más de 1.200 pacientes. El suero procedía de donantes de sangre habituales de grupo sanguíneo AB, previo consentimiento informado sobre los fines de esa donación. Recientemente se ha realizado un estudio planteando la necesidad de valorar ambos grupos de pacientes mediante un cuestionario de autoevaluación antes y después de la utilización de SA y SH (25). Los resultados se presentaron en el Congreso Internacional de Banco de Tejidos en Barcelona, 2011 (26).

Yoon (27,28,29) investigó la eficacia del suero procedente de sangre de cordón umbilical (SCU) en pacientes con ojo seco severo comparando los efectos clínicos y los niveles de componentes esenciales con el suero elaborado a partir de sangre periférica. El SCU presenta según este autor mayor cantidad de moléculas

tróficas y tras su empleo se obtienen mejores resultados clínicos. Sin embargo se trata de series cortas.

No existen en la actualidad estudios aleatorizados ni con el suficiente número de pacientes para afirmar qué fuente de obtención es la mejor para el tratamiento del ojo seco. Sin embargo, las publicaciones de Yoon y la existencia en Málaga del primer Banco de Sangre de Cordón Umbilical de Europa en número de unidades almacenadas, han propiciado este ensayo que compara el efecto clínico de los dos tipos de sueros: SA y SCU.

### 1.3. Justificación del estudio

Este estudio clínico surge de la necesidad de encontrar nuevas terapias para el ojo seco grave, especialmente para aquellos pacientes en los cuales el empleo del SA no está indicado. La justificación del presente trabajo puede resumirse en:

- a. La frecuencia del ojo seco y su insatisfactorio tratamiento produce el consecuente impacto en la calidad de vida de los pacientes y en la economía de los países desarrollados.
- b. El empleo del SA como tratamiento del ojo seco está actualmente estandarizado. Sin embargo, existen pacientes a los que no es posible o no conviene su aplicación.
- c. Los estudios realizados por Yoon son prometedores pero insuficientes. Consideramos necesarios los estudios prospectivos en forma de ensayo clínico para verificar el efecto terapéutico del SCU.
- d. En el presente ensayo clínico, se plantea un enfoque novedoso: se comparan los efectos clínicos del SCU en casos de SOS moderado-grave con la terapia con SA. Si los efectos del SCU igualan o superan en eficacia a la aplicación tópica del SA, podría aumentarse el arsenal terapéutico disponible para dicha patología.

### 1.4. Hipótesis

### 1.4.1. Hipótesis específicas

1. La aplicación tópica cinco veces al día de SA mejora los signos y síntomas derivados del ojo seco en el plazo de tres meses de tratamiento.
2. La aplicación tópica cinco veces al día de colirio SCU mejora los signos y síntomas derivados del ojo seco en el plazo de tres meses de tratamiento.
3. No inferioridad del SCU frente al SA en el tratamiento del ojo seco moderado-severo.
4. No inferioridad en la concentración de factores de crecimiento del SCU frente a SA.

### 1.4.2. Preguntas de investigación

1. ¿Es el colirio de SCU igual de eficaz que el colirio de SA para el tratamiento del ojo seco?
2. ¿Se podría utilizar, una vez probada la eficacia del colirio SCU, como alternativa al SA para estos pacientes?
3. ¿Difieren las concentraciones de factores de crecimiento, neurotróficos, vitaminas y otras moléculas en cada uno de los sueros comparados con la lágrima?
4. ¿Difieren las concentraciones de factores de crecimiento, neurotróficos, vitaminas y otras moléculas entre SA y SCU?

## 1.5. Objetivos

### 1.5.1. General

Comprobar la eficacia del SCU en el tratamiento del ojo seco moderado-severo.

### 1.5.2. Específicos

1. Medir los efectos del SA y SCU sobre la película lagrimal y la superficie ocular a lo largo de los tres meses de tratamiento del estudio, mediante las pruebas objetivas (test de Schirmer, BUT, tinción con fluoresceína, tinción

con verde de lisamina) y los síntomas, mediante el cuestionario validado de Donate.

2. Comparación de los efectos clínicos sobre la película lagrimal y la superficie ocular del SA y SCU entre sí mediante las pruebas objetivas (test de Schirmer, BUT, tinción con fluoresceína, tinción con verde de lisamina) y los síntomas, mediante el cuestionario validado de Donate.
3. Caracterización y cuantificación en las dos modalidades de suero de :
  - Proteínas: albúmina, fibronectina.
  - Vitamina A.
  - Vitamina E.
  - IgG, IgA, IgM.
  - Factor  $\beta$  Transformante del Crecimiento de Fibroblastos (TGF- $\beta$ ).
  - Factor de Crecimiento Epitelial (EGF).

## 1.6. Síntesis y *abstract*

El término síndrome de ojo seco (SOS), representa un grupo variado de afecciones que se caracterizan por disminución en la producción de lágrima o a una evaporación anormalmente rápida de la película lagrimal, con el resultado de molestias y secuelas oculares de diverso grado.

El SOS, es una patología multifactorial muy prevalente que afecta del 8 al 33% de la población. A pesar de las múltiples terapias y técnicas quirúrgicas que se emplean en la actualidad para tratarlo, existe un porcentaje elevado de pacientes en que dichos tratamientos resultan insatisfactorios.

El SA, que se realiza a partir de la sangre del propio paciente, ha demostrado ser útil en el tratamiento del ojo seco refractario y otras muchas patologías oftalmológicas de la superficie ocular, debido a que contiene factores de crecimiento y moléculas esenciales para la regeneración epitelial y el trofismo corneal en mayor concentración que en la lágrima.

Sin embargo, existen pacientes que no son candidatos a la extracción periódica de sangre o bien precisan el tratamiento con urgencia debido a una patología grave de la superficie ocular y, por tanto, el SA no es una opción

terapéutica. Recientemente se han realizado estudios piloto empleando SCU con resultados esperanzadores. Según los datos arrojados por dichos trabajos, este suero contendría más factores de crecimiento que el SA.

En este ensayo clínico pretendemos comparar los efectos de los dos tipos de suero, SA y SCU, en el tratamiento del ojo seco y determinar los factores de crecimiento, factores neurotróficos, vitaminas y otras moléculas esenciales para la nutrición de la superficie ocular en dichos sueros y valorar la introducción de nuevas opciones de tratamiento para el ojo seco.

*The dry eye syndrome (DES) is a group of ocular illnesses that have in common the ocular discomfort and the diminished tear secretion or the abnormal evaporation of the tear film.*

*The DES is a multifactorial and frequent condition: depending on the series, from 8 to 33% of the population is affected. The signs and symptoms can vary greatly, from occasional pain and redness to severe conditions of the ocular surface. Despite of the multiple treatments available, a high percentage of patients do not show improvement or experience sequelae.*

*The autologous serum (AS) eye drops are prepared from the patient's own blood. AS eye drops have shown to be useful in refractory DES and other conditions of the ocular surface. However, there are some patients with severe DES that are not candidates for blood extraction, because of their physical condition, contagious illnesses or lack of collaborative attitude. Apart from avoiding the periodical blood extraction needed for AS treatment, promising results have been published regarding the use of umbilical cord blood serum (UCBS) eye drops, that may have a higher percentage of growing factors than the AS.*

*With this clinical trial we intend to compare the clinical effects of the AS and the UCBS eye drops and quantify the growing factors, vitamins and other essential molecules for the ocular surface homeostasis, in order to explore new therapies for the DES.*

# Introducción

## 2. Introducción

### 2.1. Breve repaso histórico

El ojo seco es una patología que se conoce desde la antigüedad. Murube (30) divide en tres periodos la historia del ojo seco: a) Hipocrático o del ojo seco grave, b) Sjögrenico o del descubrimiento del ojo seco medio y c) Periodo del siglo XXI o del descubrimiento del ojo seco leve.

#### 2.1.1. Periodo hipocrático

La sangre y otros fluidos humanos (leche materna, placenta, saliva, orina y excrementos) han sido empleados desde la antigüedad para el tratamiento de diversas afecciones. El papiro de Ebers es uno de los tratados médicos conocidos más antiguos y mejor conservados. Redactado en el antiguo Egipto en el año 1534 antes de nuestra era, menciona numerosas enfermedades oftalmológicas y sus respectivos tratamientos, entre los que se encuentra el uso de la sangre en forma tópica para tratar el enrojecimiento ocular o la pérdida de visión (31, 32).

En la antigua Grecia se acuñó el término “xeroftalmía” (de *xérós*, seco, *ophthalmos*, ojo e *-ía*, sufijo de enfermedad) para aquellos ojos con una sequedad absoluta de la superficie ocular y alteraciones corneales irreversibles que provocaban ceguera. Hipócrates (460-375 a.C.) clasificaba las patologías oculares en húmedas y secas y consideraba que éstas últimas eran más graves y estaban ocasionadas por los “humores” del paciente y el ambiente (33).

Durante el Imperio Romano el ojo seco se denominaba *lippitudo arida* o *lippitudo sicca* (legañas o oftalmía seca). Se han encontrado sellos (*sigilla "ad siccam lipp"*) que regulaban la prescripción de colirios para estos ojos secos graves (33). Aulo Cornelio Celso (25 a. C. - 50 d. C.) describe la “oftalmia seca” en su tratado *De Re Medica* como una enfermedad en la que no se produce lagrimeo ni tumefacción y en la que se da hiperemia, pesadez y picor, así como adherencia palpebral durante la noche.

Galeno (130-200 a.C.) distinguía dos enfermedades que hoy podemos

considerar como ojo secos (33): la *sklerophthalmia* (del griego, *sklerós*, que significa “duro”) en la que el ojo estaba endurecido y poco móvil y la *xerophthalmia*, que cursaba con molestias, picor y lágrima “salmuera y nitrosa” (33). Pablo de Egina (s. VII d.C.) en su obra *Hypomnema* recogía el concepto de Galeno y definía el ojo asociado a la escleroftalmía como duro, doloroso, hiperémico y con limitación a la movilidad.

En el siglo XVII siguen vigentes los postulados de los médicos clásicos. Plenck dividió el ojo seco en cuatro clases: *exhaustaustorum*, *itinirerarium*, *febrile* e *inflammatorium*. Según Murube, podrían deberse a etiologías nutricionales las dos primeras clases y a síndromes tipo Stevens-Johnson y conjuntivitis cicatriciales la tercera y cuarta causa, respectivamente (30).

### 2.1.2. Periodo sjögrénico

El periodo sjögrénico se inició en el siglo XIX. La medicina de este periodo adopta un carácter más científico, con un continuo desarrollo de nuevas técnicas y conceptos. Se investiga en diversos campos y surgen destacados médicos y científicos como Virchow, Rokitsanski, Claude Bernard, Luis Pasteur, Robert Koch, Purkinje, Addison, Santiago Ramón y Cajal, etc.

Se identifican los ojos secos menos graves, por lágrima insuficiente cuya merma provocaba alteraciones reversibles en la superficie ocular. Surgieron entonces por parte de los grandes oftalmólogos de la época nuevas denominaciones para designar los síntomas y signos que observaban en la práctica clínica (30), tales como la *xerosis epithelialis* descrita por Raymond, la *keratopathia filamentosa* acuñada por Leber o *keratitis sicca* observada por Duke-Elder.

Henrik Samuel Conrad Sjögren (1899-1986) definió el término *keratoconjunctivitis sicca* en su tesis doctoral “*Zur Kenntnis der keratoconjunctivitis sicca*”, basándose en cuatro casos que había publicado anteriormente. Curiosamente, su trabajo doctoral no obtuvo la calificación suficiente como para permitirle en ese momento acceder a los estudios de oftalmología. Gougerot, en 1925, y Houwer, en 1927, habían descrito parcialmente la entidad (de hecho, algunos autores como Paganoni denominaron el Síndrome como de Gougerot-Houwers-Sjögren). Sin embargo, fue Sjögren el que más datos



clínicos e histológicos aportó al conocimiento de este síndrome y el que propuso su naturaleza generalizada, asociado a enfermedades del tejido conectivo (34).

### 2.1.3. Descubrimiento del ojo seco leve

En la última mitad del siglo pasado se detecta el ojo seco leve, sintomático, pero sin signos claros en la exploración. En 1950, von Rötth introdujo el término “*Dry Eye*” para cualquier tipo de insuficiencia de las glándulas lagrimales. Wolf introdujo el concepto de la película lagrimal constituida por tres capas diferenciadas: mucinosa, acuosa y lipídica, cada una de las cuales presentaba una función específica. Posteriormente se introdujo el concepto de alteración de la estructura trilaminar de la película lagrimal causada por acuodeficiencia (35), mucodeficiencia (36), lipodeficiencia (37) o epiteliopatía (38).

Por su parte, Thoft y Fiend (39) concebían la película lagrimal como parte funcional y anatómica de la superficie ocular y Stern (40) concluye en su artículo que la unidad funcional lagrimal estaba constituida por las glándulas lagrimales, la superficie ocular y sus interconexiones nerviosas. Paralelamente diversos estudios ponen de manifiesto el papel clave de la reacción inflamatoria en la génesis y cronificación del proceso, descrita con anterioridad en el ojo seco asociado al síndrome de Sjögren pero sin un protagonismo destacable hasta el momento en ojos secos no relacionado con el síndrome de Sjögren (34).

En el siglo XX hubo nuevos intentos para emplear el suero en diversas concentraciones y formulaciones como terapia para la sequedad de la superficie ocular (31), entre los que podemos citar a Fromaget (1930), Rucker (1938), Hamilton (1940), Grawitz (1960) y Bisantis (1976). Los trabajos de Fox (4), en 1984, contribuyeron al conocimiento de su mecanismo de acción. En nuestro país, el empleo de derivados hemáticos para el tratamiento de patologías oculares ha suscitado un gran interés en las últimas dos décadas, dando lugar a gran número de publicaciones entre las cuales se pueden destacar las de Alió (41,42,43), Alvarado Valero (44), Bosch-Valero (7), del Castillo (13), López-García (9,11) Díaz Llopis (45), García Gómez (46), López-García (9,18) y López-Plandolit (47).

Surge entonces la necesidad de una clasificación y una sistematización del

cuerpo teórico existente, así como de protocolos de tratamiento basados en la evidencia. En 2007 se reúne un comité de expertos patrocinado por la *Tear Film & Ocular Surface Society* para analizar los avances en el ojo seco (Dry Eye WorkShop, DEWS, 2007). Se introduce entonces el concepto de “Superficie Ocular” para designar al conjunto formado por la superficie ocular, las glándulas lagrimales y el conducto nasolacrimal. Se realiza asimismo una definición del síndrome de ojo seco (SOS) incorporando estos nuevos conceptos: “Una enfermedad multifactorial de la lágrima y de la superficie ocular que provoca molestias oculares, alteraciones visuales e inestabilidad de la película lagrimal, teniendo esta última el potencial de producir daño en dicha superficie ocular. Esta enfermedad se acompaña de osmolaridad aumentada de la lágrima e inflamación de la superficie ocular” (48).

## 2.2. La superficie ocular y la película lagrimal

### 2.2.1. Recuerdo anatómico y fisiológico

La zona externa del ojo es la porción más importante del cuerpo humano expuesta al exterior. La estructura y función normales de un ojo sano se basan en la homeostasis de todo el cuerpo para protegerlo frente a un medio ambiente adverso.

La superficie ocular se compone de:

- a. Anejos oculares.
- b. Glándulas lagrimales.
- c. Conjuntiva.
- d. Limbo.
- e. Córnea.

Tseng (49) establece cinco postulados esenciales y vigentes de la superficie ocular:

- La salud de la superficie ocular está asegurada por una estrecha relación entre la superficie ocular y la película lagrimal pre-ocular.
- Una película lagrimal estable depende de los anejos externos.
- El mecanismo de protección innato es controlado por una integración

neuroanatómica eficaz.

- Las células madre epiteliales se encuentran en el limbo corneal.
- La función ocular de células epiteliales necesitan el apoyo de los fibroblastos del estroma y la matriz.

### 2.2.1.A. Anejos oculares

Los anejos oculares están compuestos por los párpados, las cejas y las pestañas. Son adyacentes y contiguos a la superficie ocular y contribuyen a la defensa y lubricación de la misma.

El reborde orbitario y los párpados actúan de barrera inicial. Los párpados además evitan la desecación corneal, renovando la película lagrimal por medio del parpadeo. El borde libre palpebral constituye la unión muco-cutánea entre la epidermis (epitelio queratinizado) y el epitelio conjuntival (no queratinizado). Las glándulas de Zeiss y Meibomio vierten su contenido en el borde libre palpebral, contribuyendo a su lubricación y constituyendo un barrera que impide el rebosamiento del menisco lagrimal (50).

Las cejas y pestañas, por su parte, recogen pequeñas partículas, además éstas últimas actúan como sensores estimulando el reflejo de parpadeo, evitando así el contacto de cuerpos extraños con la superficie ocular.

### 2.2.1.B. Glándulas lagrimales

Es una glándula sebácea modificada especializada. Se ocupa de la secreción lagrimal refleja por estimulación parasimpática del VII par. Presenta dos lóbulos separados por el *septum* orbitario, que vacían su contenido a los fondos de saco conjuntivales súpero-temporales. Las glándulas lagrimales accesorias de Wolfring y Krause se encuentran inmersas en el estroma conjuntival.

### 2.2.1.C. Conjuntiva

La conjuntiva es una membrana mucosa transparente que tapiza el globo ocular (conjuntiva bulbar), redonda en los fondos de saco (conjuntiva del fórnix) y recubre la superficie interna de los párpados hasta el borde libre (conjuntiva tarsal).

Presenta un epitelio estratificado no queratinizado y un estroma laxo. En

situaciones de agresión (quemaduras químicas, enfermedades sinequiantes, déficit de vitamina A), el epitelio conjuntival puede queratinizarse, dando lugar a metaplasia escamosa.

Funciones:

- Secreción de mucina.

La conjuntiva contiene las células caliciformes, responsables de la secreción apocrina de mucina, el componente más interno de la película lagrimal. Secretan dichas glicoproteínas en respuesta a la agresión de la superficie ocular por mediadores inflamatorios, traumas o toxinas (50). Las células caliciformes son más abundantes en la carúncula, el pliegue semilunar y los fondos de saco.

- Deslizamiento de los párpados.

Permite el deslizamiento correcto de los párpados sobre el globo ocular y del mismo globo.

- Inmunogénesis.

Es un elemento del *tejido linfoide asociado a la mucosa* (MALT), conformando el *tejido linfoide asociado a conjuntiva* (CALT). Presenta gran potencial inmunogénico debido a que el estroma y la matriz extracelular subyacente son ricos en vasos sanguíneos, células inmunocompetentes (linfocitos, leucocitos polimorfonucleares, células plasmáticas y mastocitos) y células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas.

- Absorción de sustancias.

Posee la capacidad de absorber sustancias diluidas en la película lagrimal (bien por fagocitosis, bien sea a través de las uniones intercelulares). Esta propiedad permite el efecto terapéutico de los colirios, que se instilan en los fondos de saco (50).

#### 2.2.1.D. Limbo

El limbo representa la zona de transición entre el epitelio conjuntival y corneal. De hecho, sus características fenotípicas y bioquímicas son intermedias

(51). A este nivel, la conjuntiva adopta una disposición en forma de pliegues radiales visibles oftalmoscópicamente llamados empalizadas de Vogt.

Funciones (50, 51):

- Regeneración del epitelio corneal.
- Inhibición de la conjuntivalización corneal por parte de las células madre corneales.
- Nutrición de la córnea periférica.
- Cicatrización corneal.
- Inmunovigilancia de la superficie ocular y las respuestas de hipersensibilidad.

### 2.2.1.E. Córnea

La córnea es la porción anterior transparente y avascular del globo ocular. Es la superficie refractiva más importante del ojo, presenta una anatomía y regulación inmunológica complejas, así como una innervación profusa.

Características:

#### a) Poder refractivo.

La córnea tiende a la esfericidad, sobretodo en su zona central, más delgada, denominada zona óptica. Tiene un poder de refracción de unas 43 dioptrías aproximadamente y representa el 70% de la capacidad refractiva ocular (52).

#### b) Transparencia.

Se basa en sus características anatómicas. La córnea posee seis capas: el epitelio corneal, la membrana de Bowman, el estroma, la capa pre-descemética, la membrana de Descemet y el endotelio.

- Epitelio corneal.
  - Es la porción de la córnea que forma parte del concepto “superficie ocular”. Se trata de un epitelio escamoso no estratificado. Las células epiteliales se encuentran fuertemente conectadas entre sí por uniones intercelulares (desmosomas y *gap-junctions*) y a la

membrana basal por hemidesmosomas y monofilamentos. Ésta, confiere al epitelio corneal impermeabilidad ante solutos no iónicos (evitando el paso de agua al estroma) y capacidad de adherencia (50).

- El epitelio corneal precisa para su correcto funcionamiento glucosa, vitaminas y aminoácidos, que proceden del humor acuoso en su mayor parte. Casi todo el oxígeno se obtiene de la película lagrimal por difusión (50).
- El epitelio corneal posee tres tipos celulares:
  - Células basales, columnares. Procedentes de células amplificadoras transitorias del limbo. Forman una monocapa y mediante sus frecuentes mitosis renuevan el epitelio corneal, dando lugar a las células alares.
  - Células alares, poligonales. Constituyen la segunda capa celular.
  - Células apicales, planas y hexagonales. Presentan un rico glicocálix que interactúa con las mucinas para facilitar la adherencia de la película lagrimal. Se descaman hacia la lágrima cada 7-14 días, cuando la capa de células apicales subyacentes ya está formada (50, 52).
- En caso de lesión epitelial, las células apicales adyacentes a la zona afecta se desplazan mediante movimiento ameboide para su reparación, mientras que la matriz extracelular actúa como soporte, facilitando la migración e inserción de las células epiteliales (50). La fibronectina presente en la lágrima y secretada por los queratocitos favorecen la adhesión epitelial. La remodelación de la membrana basal por parte de las metaloproteinasas también contribuye a regenerar el epitelio corneal frente a las agresiones (50). En las lesiones epiteliales se regenera el epitelio por completo y no se afecta la transparencia corneal.

- **Membrana de Bowman.**

Representa una barrera ante traumatismos e infecciones. Carece de capacidad regenerativa, por lo que cuando se lesiona se produce una reparación en la que se pierde la transparencia y el grosor originales.

- Estroma.
  - Constituye aproximadamente el 90% del espesor corneal. Consta fundamentalmente de fibras de colágeno (sobre todo tipo I), queratocitos, sustancia propia (proteoglicanos como el queratán sulfato y el condroitín sulfato) y agua (casi el 80%). Las fibrillas de colágeno representan aproximadamente el 80% del peso en seco del estroma corneal (53).
  - Las características de las fibras de colágeno del estroma contribuyen a la transparencia corneal debido a:
    - Su pequeño diámetro, el menor de cuantos tejidos colágenos hay en el organismo, se estima en unos 250-300 Å.
    - Su ordenada disposición en haces de 200 a 300 fibrillas recorren la total longitud de la córnea, paralelas a la superficie en el estroma anterior y perpendiculares en el estroma posterior.
    - La transparencia corneal se obtiene asimismo por la ausencia de vasos sanguíneos y linfáticos, la ausencia de vainas de mielina de los nervios corneales y la adecuada hidratación del estroma corneal.
  - Los queratocitos son células grandes, con abundante retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias. Elaboran el colágeno y la matriz extracelular del estroma. Si existe lesión estromal, los queratocitos se desplazan al lugar de la lesión y se transforman fibroblastos, produciendo colágeno.
- Capa pre-descemética.
 

Ha sido descrita recientemente (54) y su existencia aún no está plenamente aceptada por la comunidad científica. Mide unas 15 micrómetros y es muy resistente e impermeable al aire, lo cual puede tener implicaciones en los trasplantes de córnea lamelares (55).
- Membrana de Descemet.
 

Está compuesta por un fino enrejado de fibrillas de colágeno. Es la membrana basal del endotelio y, a diferencia de la membrana de Bowman, se desprende fácilmente y se regenera con rapidez.
- Endotelio.

Es una monocapa de células planas hexagonales sin capacidad mitótica “in vivo” probada cuya densidad va disminuyendo gradualmente conforme avanza la edad: desde las 3.500-4.000 células/mm<sup>2</sup> al nacer hasta las 2.500-3.000 células/mm<sup>2</sup> de una córnea adulta sana. Cuando se daña una porción de endotelio, las células vecinas aumentan de tamaño y suplen a las células alteradas. La función del endotelio radica en impedir la hidratación del estroma mediante el bombeo en contra de gradiente del humor acuoso, manteniendo así el equilibrio hídrico de la córnea. Esa función se puede mantener con una densidad de hasta 600 células/mm<sup>2</sup>. Por debajo de 500 células/mm<sup>2</sup> se produce edema del estroma y se altera por lo tanto la transparencia corneal.

c) Privilegio inmunológico.

La reacción frente a antígenos extraños (incluido el trasplante corneal) se encuentra disminuida. Esto se debe a los siguientes factores (51):

- Ausencia de vasos sanguíneos y linfáticos y por lo tanto de células inmunes.
- Existencia de factores inmunoreguladores de acción depresora en la córnea, como el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- $\beta$ ) y la Hormona Alfa Estimuladora de los Melanocitos ( $\alpha$ -MSH).
- Expresión del ligando Fas en las células corneales, que actúa induciendo la apoptosis de los linfocitos activados.

d) Inervación.

La córnea es el tejido más densamente innervado del organismo. Se calcula que en la córnea posee una inervación sensitiva 300 veces mayor que la de la piel y 80 veces del tejido dentario (56). La inervación sensitiva de la córnea (50,53) tiene lugar a través de las ramificaciones de los nervios ciliares largos, ramas del V par craneal, y probablemente con participación de los nervios ciliares posteriores cortos, ramas del nervio nasociliar. Los nervios penetran a través del estroma corneal en las zonas nasal y temporal, discurren paralelos a las fibras de colágeno, pierden su vaina de mielina, disminuyen de diámetro y se ramifican, formando así el plexo estromal anterior. Posteriormente, atraviesan la membrana de Bowman para formar un plexo denso a nivel subepitelial, que constituye el plexo sub-basal. Finalmente, terminan



su trayecto entre las células epiteliales como terminaciones libres epiteliales (56). Casi todas las células basales están en contacto con un nervio. Estas terminaciones nerviosas superficiales responden a estímulos mecánicos, térmicos y químicos. Actúan liberando neurotransmisores que regulan el metabolismo de las células epiteliales. Asimismo, ramas recurrentes de estos nervios inervan el limbo y la conjuntiva circundante.

e) Trofismo corneal.

Los neurotransmisores liberados desde las terminaciones nerviosas superficiales regulan el trofismo corneal, desde el metabolismo hasta la diferenciación celular. La denervación corneal produce las siguientes alteraciones en la superficie ocular:

- Altera la mitosis de las células basales del epitelio corneal, disminuyendo la posibilidad de recambio celular.
- Provoca la disminución de las microvellosidades del glicocáliz y por tanto la pérdida de adherencia de la película lagrimal.
- Disminuye la frecuencia del parpadeo por disminución de la respuesta a estímulos (hipoestesia corneal).

## 2.2.2. La secreción lagrimal

La película lagrimal es de importancia capital para la visión y la integridad de la superficie ocular.

### 2.2.2.A. Funciones

La película lagrimal presenta una cuádruple función:

- Óptica.

La interfase de la película lagrimal precorneal-aire es la superficie refractiva inicial del ojo, necesaria para una óptima calidad visual.

- Mecánica.

La lágrima lubrica la superficie ocular, diluye y elimina los agentes nocivos y facilita la llegada de los leucocitos a la córnea.

- Nutricia para la córnea.

Gracias a los factores de crecimiento fundamentales para la homeostasis del

epitelio y la permeabilidad al oxígeno.

- Antibacteriana.

Debido a la multitud de moléculas antimicrobianas que contiene.

### 2.2.2.B. Componentes

Se estima que la lágrima contiene más de 500 tipos de proteínas (56). La composición de la película lagrimal debe mantenerse dentro de límites cuantitativos y cualitativos bastante estrechos para preservar la integridad y el funcionamiento correcto del sistema visual. Las anomalías de la película lagrimal que afectan a sus componentes o a su volumen provocan disfunción grave de los párpados y la conjuntiva, con pérdida simultánea de la transparencia corneal.

Se mencionan a continuación algunas de las moléculas contenidas en la secreción lagrimal que desempeñan una función más destacada (56, 57):

#### a) Factores de crecimiento:

- Factor de Crecimiento Eitelial (EGF).  
Acelera el proceso de migración de las células epiteliales contando con efectos antiapoptóticos. Se ha mostrado efectivo en la curación de erosiones epiteliales.
- Factores de Crecimiento Transformante Beta (TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2)  
Implicados en los procesos de reparación epitelial y estromal. El TGF- $\beta$ 1 también se considera una citoquina anti-inflamatoria.
- Factor de Crecimiento Transformante Alfa (TGF  $\alpha$ ), Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF), Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos (FGF-2), Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF).  
Implicados en procesos de respuesta a lesión epitelial.
- Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF).  
Su isoforma AB se activa intracelularmente mientras es secretada por los gránulos alfa de las plaquetas y favorece la mitosis y la cicatrización.
- Factor de Crecimiento Insulin-like 1 (IGF-1).  
Implicado en la migración y adhesión del epitelio corneal.
- Factor de Crecimiento Neuronal (NGF).  
Importante para la neurogénesis.

b) Moléculas con actividad antimicrobiana:

- IgG, IgE, leucocitos, y factores del complemento.  
Aportan efecto bacteriostático y bactericida.
- IgA secretora.  
Minimiza la adherencia de las bacterias a la mucosa, neutraliza virus y toxinas en la lágrima y regula el desarrollo de la flora normal.
- Lisozima.  
Actúa hidrolizando uniones de la pared celular de las bacterias Gram negativas y ciertos hongos, provocando la lisis celular.
- Lactoferrina.  
Capta hierro, privando así por competencia a las bacterias Gram +, que precisan del hierro para su metabolismo. Potencia la función de los linfocitos *Natural Killer* (NK).
- Ácidos grasos de cadena corta y larga.  
Desestabilizan la membrana celular bacteriana e inhiben el metabolismo bacteriano, respectivamente.
- Lipocalina, lipofilina, catepsinas, metaloproteinasas y fosfolipasa A2.

c) Moléculas esenciales para apoyar la proliferación, migración y diferenciación de los epitelios córneo-conjuntivales:

- Fibronectina. Capital en la migración celular.
- $\alpha$ -2 macroglobulina. Presenta actividad anticolagenasa.
- Albúmina. Posee actividad antiapoptótica.
- Vitamina A. Previene los procesos de metaplasia escamosa epitelial.
- Sustancia P y calcitonina. Implicadas en la migración y adhesión del epitelio corneal.

La falta de estos factores epiteliotróficos puede derivar en una afectación severa de la superficie ocular.

### 2.2.2.C. Propiedades físico-químicas

Propiedades físico-químicas más importantes de la lágrima (50,56,57):

- Grosor de la película lagrimal. Se ha estimado clásicamente en unas 7-9  $\mu\text{m}$ .

Sin embargo, los estudios de Prydal (58) con microscopía confocal e interferometría hablan de un grosor de 40  $\mu\text{m}$ . Por su parte, King-Smith (59), empleando la técnica de reflexión espectral, encuentra una película lagrimal de unas 3  $\mu\text{m}$ .

- Volumen. De 6-9  $\mu\text{l}$ .
- pH. Entre 6,5 – 7,6.
- Osmolaridad. Entre  $302 \pm 9,7$  mOsm/L (60).
- $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Mayor concentración que en el plasma.
- Glucosa. Menor concentración que en el plasma.

#### 2.2.2.D. Estructura

La división de la película lagrimal en tres estratos se conoce desde 1892 gracias a Terson, pero fue Wolf en 1946 quien postuló que la película lagrimal está constituida por tres capas perfectamente diferenciadas: mucinosa, acuosa y lipídica, cada una de las cuales con una función específica (34, 61).

Esta presunta estructuración estratigráfica, que ha permanecido casi inalterada desde su descripción inicial, está siendo sometida actualmente a revisión ya que, según diversos estudios, las capas mucinosa y acuosa no existirían con independencia sino como una mezcla con la consistencia de un gel, con la mucina más concentrada en la interfase epitelial (62).

A continuación se describen las características de las capas de la película lagrimal (50,56,62,63). Con fines esquemáticos, se describe la película lagrimal tradicional, compuesta por tres capas, aunque, como se ha comentado, esta división no es estricta, sino que las tres capas forman un *continuum*:

##### a) Capa lipídica.

- La más exterior. Muy delgada (15-157  $\text{nm}$  de grosor [60]). Producida por las glándulas sebáceas modificadas de Meibomio (y en menor medida por las glándulas de Moll y Zeiss), constituye una mezcla de fosfolípidos hidrofílicos (polares) y ceras, ésteres de colesterol y triglicéridos hidrofóbicos (no polares) en estado líquido a la temperatura de la superficie ocular. Los lípidos hidrofílicos están en contacto con la capa acuosa y los hidrofóbicos hacia la interfase aérea.

- Funciones:
  - Retrasar la evaporación de la lágrima.
  - Mejorar su estabilidad, manteniendo la tensión superficial de la película lagrimal (actúa como surfactante).
  - Contener el menisco lagrimal.
- La disfunción de las glándulas de Meibomio (DGM) es una causa frecuente de película lagrimal inestable y produce un Ojo Seco Evaporativo (OSE).

#### b) Capa acuosa.

- La capa intermedia y mayor volumen (6'5  $\mu\text{m}$  de grosor). Secretada por las glándulas lagrimales principales (sitas en la órbita) y secundarias de Krause y Wolfring (sitas en la conjuntiva). Se compone de agua, electrolitos, mucinas y proteínas disueltas, así como factores de crecimiento y citocinas. También aparecen las células epiteliales descamadas del epitelio corneal y conjuntival y algunas células derivadas del tejido linfoide y los vasos sanguíneos (51).
- Funciones:
  - Transporte de los nutrientes hidrosolubles. Para la nutrición corneal.
  - Protección. Elimina desechos, permite el paso de células inmunitarias tras una lesión y posee función antibacteriana.
  - Proporcionar una superficie óptica lisa a la córnea.
- La deficiencia de lágrima acuosa o Ojo Seco Acuo-Deficiente (OSAD) es una causa frecuente de ojo seco.

#### c) Capa mucínica.

- Es la capa más interna. Tiene unas 0'2-0'5  $\mu\text{m}$  de grosor. Las mucinas son glucoproteínas de alto peso molecular, producidas por las células caliciformes conjuntivales. Conforman el glicocálix de las microvellosidades de las células epiteliales de la córnea, comportándose como moléculas antipáticas (adhieren tanto moléculas hidrofílicas como hidrofóbicas). La correcta secreción de las mucinas depende de la presencia de la vitamina A y los retinoides, pero también son secretadas en respuesta a la irritación de la superficie ocular por mediadores inflamatorios, traumas o toxinas, de modo que en los procesos inflamatorios agudos aumenta la

densidad de células caliciformes. Por el contrario, en los procesos inflamatorios crónicos o cicatriciales (síndrome de Sjögren, penfigoide, síndrome de Stevens-Johnson, quemaduras oculares...), disminuye la densidad de células caliciformes.

- Funciones:
  - Adherir la película lagrimal al epitelio corneal.
  - Mejorar la capacidad de diseminación de la capa acuosa sobre el epitelio corneal.
  - Regular la tensión superficial.
  - Lubricar y proteger las células epiteliales.
  - Convertir el epitelio corneal en una superficie hidrofílica.
  - Favorecer la captura y arrastre de cuerpos extraños, detritus y microorganismos, atrapar factores tróficos, leucocitos y citocinas.
- Su deficiencia provoca formas graves de ojo seco, ya sea de tipo evaporativo (OSE) o hiposecretor (OSAD).

### 2.2.3. La unidad funcional lagrimal

La Unidad Funcional Lagrimal (UFL) es un sistema integrado complejo que controla los componentes principales de la película lagrimal de forma regulada y responde a influencias medioambientales, endocrinas y corticales.

#### 2.2.3.A. Funciones

- Secreción y eliminación del fluido lagrimal mediante el aparato lagrimal.
- Regulación neurogénica de la secreción lagrimal.
- Preservación de la integridad de la película lagrimal y la transparencia de la córnea mediante el mantenimiento del epitelio de la superficie ocular y el estroma subyacente (51).

#### 2.2.3.B. Componentes

La UFL está compuesta por:

- Las glándulas lagrimales.
- La superficie ocular (córnea, conjuntiva y glándulas de Meibomio).

- Los párpados y demás anejos.
- Los nervios sensoriales y motores que los conectan y posibilitan el parpadeo (62).

### 2.2.3.C. Aparato y secreción lagrimal

La película lagrimal se secreta y mantiene gracias a un sistema elaborado: el aparato lagrimal, que tiene componentes secretores, de distribución y excretores (56).

a) Componente secretor. Comprende: la glándula lagrimal (produce alrededor del 95% de la secreción), el tejido glandular accesorio, las glándulas sebáceas de los párpados, las células caliciformes y otros elementos secretores de mucina de la conjuntiva. Existen tres variedades de lacrimación: basal, refleja y emocional. Se ha considerado tradicionalmente que la lacrimación basal se lleva cabo por las glándulas lagrimales accesorias y que la glándula principal, con innervación secretoria, produciría los tres tipos de secreción. No obstante, estudios recientes cuestionan esta fragmentación clásica de la secreción lagrimal y postulan que ambos tipos glandulares responden al unísono a una regulación neural constante mediante un mecanismo reflejo regulador común (34, 56).

b) Componente de distribución. El parpadeo y los movimientos oculares distribuyen uniformemente la película lagrimal sobre la superficie ocular.

c) Componente excretor. El sistema de drenaje elimina la porción de la película lagrimal que no se ha evaporado. La eliminación de las secreciones lagrimales se basa en el movimiento a través del ojo, favorecido por el parpadeo y un sistema de drenaje que consta de los puntos lagrimales, los canaliculos, el saco lagrimal y el conducto lacrimonasal.

### 2.2.3.D. Innervación y mecanismo de lacrimación

La innervación de la superficie ocular y la UFL puede resumirse de la siguiente manera (57,65):

- El arco aferente de la secreción lagrimal está constituido por los nervios sensoriales de la córnea, la conjuntiva y los párpados, que responden a la

temperatura, el grado de humedad y las agresiones del entorno enviando señales a ganglio trigémino. La respuesta del lagrimeo se vehicula a través de los núcleos preganglionares parasimpáticos.

- Otra vía neural controla el reflejo del parpadeo: la vía trigeminal y las fibras eferentes somáticas del séptimo par craneal.

## 2.3. Síndrome de ojo seco

### 2.3.1. Introducción

El ojo seco es una enfermedad frecuente y multifactorial. Se asocia sobre todo a edad avanzada, mujeres post-menopáusicas, enfermedades autoinmunes, el uso de algunos fármacos y a enfermedad de la superficie ocular.

Diversos factores alteran la secreción o composición de la película lagrimal, produciéndose inestabilidad e inflamación continuada de la superficie ocular, lo que conlleva la alteración de la homeostasis de la misma.

Los síntomas más frecuentes son las molestias oculares (quemazón, picor, sensación de pinchazos, arenilla, cuerpo extraño, fatiga o lagrimeo) y visión borrosa. En ocasiones, las alteraciones oculares pueden ser graves, requiriendo intervenciones quirúrgicas o bien ocasionando una pérdida importante de la agudeza visual.

El SOS puede manifestarse como una patología aguda o crónica. En el caso del SOS crónico, las alteraciones cuantitativas o cualitativas de la lágrima provocan la sensación de malestar permanente, ocasionando implicaciones significativas en el ámbito económico y en la calidad de vida de los pacientes.

Se ha avanzado mucho en los últimos años en el conocimiento de la fisiopatología del SOS, no así en su tratamiento, que sigue siendo en muchos casos insatisfactorio.

### 2.3.2. Epidemiología del ojo seco



El SOS es una de las patologías oculares más frecuentes. Se calcula que la prevalencia del ojo seco varía del 5% al 34% (60) dependiendo del estudio, los criterios diagnósticos y la población estudiada. Se trata, por lo tanto, de un problema de salud pública de primer orden.

El *Beaver Dam Study* (66) halló una prevalencia de ojo seco del 14% en los adultos de entre 48 a 91 años. Esto supondría unos 3,2 millones de mujeres y 1,05 millones de hombres afectados de ojo seco en EE.UU. Afecta más frecuentemente (67) a mujeres post-menopáusicas, ancianos y pacientes con enfermedades autoinmunes (estos últimos suponen aproximadamente el 8% de la población, y en un 78% se trata de mujeres).

Estudios epidemiológicos internacionales refrendan cifras similares o superiores en todo el mundo: el *Women's Health Study* (68) refleja que la prevalencia de ojo seco sintomático en individuos mayores de 50 años es de un 7% en mujeres y un 4% en hombres en EE.UU. La prevalencia estimada de SOS en Australia (69) es del 7,4% de la población, incrementándose dicho porcentaje en mujeres mayores de 50 años y ancianos. Un estudio realizado en Indonesia (70) calculó que la prevalencia ascendía al 27,5% de la población, y se asociaba con la edad proveya, el hábito tabáquico y la presencia de pterigium. En un estudio realizado en Taiwan (71), la prevalencia de SOS entre los ancianos fue del 33,7%, siendo las mujeres las que más referían más síntomas. El porcentaje de pacientes afectados de SOS en Canadá (72) se estimó en un 26% y en un 33% en Japón (73).

Las variaciones en las estimaciones de la prevalencia del SOS pueden atribuirse a la falta de una definición clara del mismo y la variabilidad de las poblaciones estudiadas. Por otro lado, un porcentaje nada desdeñable de la población afecta de SOS tiende a auto-med icarse, por lo que la prevalencia que los estudios anteriormente mencionados calculan varía dependiendo de si los datos proceden de la población general o de los datos proporcionados por facultativos.

Asimismo, estos últimos datos dependen a su vez de los criterios empleados por los médicos para diagnosticar el SOS. De hecho, el porcentaje del 33% obtenido en el *Beaver Dam Study* (66) se obtuvo de un estudio poblacional mediante cuestionario. De los pacientes que referían tener ojo seco, sólo el 11% habían acudido al médico. Los porcentajes de prevalencia más bajos se hallan en los estudios que se basan en los datos de oftalmólogos especializados en superficie

ocular, ya que no tiene en cuenta los pacientes tratados por los oftalmólogos generales y los médicos de atención primaria, así como aquellos que no consultan (64).

### 2.3.3. Clasificación del ojo seco

El ojo seco se clasifica en función de sus causas etiológicas, mecanismos desencadenantes y severidad de la condición.

#### 2.3.3.A. Clasificación etiológica del ojo seco

La clasificación de Madrid de Murube (74) proporciona una completa etiología del ojo seco por factores:

a) Factores etarios.

A partir de los 30 años de edad, comienza a disminuir la producción lagrimal. A partir de los 60 años existe un mayor o menor grado de insuficiencia lagrimal en todos los individuos.

b) Factores hormonales.

Los andrógenos tienen efecto en las glándulas lagrimales y de Meibomio y modulan la respuesta inmune mediante el TGF- $\beta$ . Por tanto, se producen síntomas de ojo seco en estados carentes de andrógenos como el climaterio, la postmenopausia, la anticoncepción estrogénica y el uso de antiandrogénicos.

c) Factores auto-inmunes.

- En enfermedades auto-inmunes sistémicas.

En el síndrome de Sjögren, se produce una infiltración linfocítica de las glándulas exocrinas y mucosas que da lugar a una disminución secundaria de la secreción lagrimal.

- En enfermedades mucosinequiantes.

El penfigoide ocular cicatricial y el síndrome de Stevens-Johnson se producen autoanticuerpos contra la membrana basal epitelial de la piel y las mucosas que provocan una cicatrización conjuntival con obstrucción secundaria de los conductos de la glándula lagrimal que

impide la liberación de la secreción lagrimal.

- En enfermedad injerto contra huésped (EICH).

La causa principal de queratoconjuntivitis seca es la afectación de la glándula lagrimal principal, que es infiltrada por linfocitos, causando su destrucción.

d) Factores farmacológicos.

Multitud de fármacos de uso frecuente provocan ojo seco: benzodiacepinas (bromazepam, diazepam, cloracepato dipotásico), antidepresivos, anticolinérgicos (atropina), betabloqueantes, Isotretinoína, Amiodarona, Interferón, diuréticos (Furosemida, Clortalidona, Espironolactona, Amilorida+Hidroclorotiacida, Metildopa), antidepresivos tricíclicos, antipsicóticos (Clorpromazina, Levomepromazina, Flufenazina, Haloperidol), antiparkinsonianos (Biperideno, Levodopa+Benserazida), antihistamínicos (Hidroxicina, Cetirizina), espasmolíticos (Escopolamina, Pitofenona), Tamoxifeno, anticonceptivos orales y terapia hormonal sustitutiva postmenopáusica.

e) Factores nutricionales.

- La deficiencia de vitamina A produce un ojo seco grave, la xeroftalmía, que presenta unas lesiones características en la conjuntiva bulbar, denominadas manchas de Bitot.
- El alcoholismo crónico y la desnutrición pueden provocar también ojo seco.

f) Factores traumáticos.

La destrucción de las glándulas acuosas (radiación, extirpación de tumores), mucínicas (causticaciones, intervenciones quirúrgicas) o lipídicas (reconstrucciones palpebrales) producen una alteración cualitativa de la lágrima.

g) Factores inflamatorios.

La inflamación de las glándulas secretoras, ya sea infecciosa o de otra causa, conduce a la alteración lagrimal: dacrioadenitis (glándulas acuosas), conjuntivitis cicatriciales (células caliciformes) o blefaritis (glándulas de

Meibomio).

h) Factores neurodeprivativos.

La queratopatía neurotrófica está causada por la pérdida de la sensibilidad y el trofismo corneales dependientes del V par, lo que conduce a la destrucción del epitelio y provoca trastornos de la re-epitelialización. Asimismo se produce una depresión del reflejo del lagrimeo, que agrava el cuadro. La causa más frecuente son las infecciones oculares por herpes, sobretudo zóster. Puede deberse también a traumatismo quirúrgico, accidentes cerebro-vasculares, aneurismas, esclerosis múltiple, tumores, lepra, abuso de anestésicos tópicos y causas hereditarias, como el síndrome de Riley-Day.

i) Factores tantálicos.

Situaciones en las que no existe propiamente déficit o alteración lagrimal, sino imposibilidad para aprovecharla. Se produce un ojo seco funcional, es decir, existe una producción lagrimal normal pero debida a una epitelopatía corneal hidrofóbica o incongruencia palpebroocular, se produce la sintomatología de ojo seco. Las alteraciones palpebrales impiden la correcta distribución de la lágrima sobre la superficie ocular (ectropion, entropion, exoftalmos, síndrome del párpado flácido, pterigium). Las superficies corneales hidrófobas no pueden aprovechar la lágrima, como ocurre en las epitelopatías o en las distrofias corneales. Es un término introducido por Murube (74) y que se inspira en la mitología griega.

j) Enfermedades sistémicas.

Parkinson, diabetes, SIDA y hepatitis C.

k) Disgenesias.

Se asocian con ausencia o reducción del tejido lagrimal: alacrimia, displasia ectodérmica anhidrótica, aniridia, síndrome de epicantus-blefarofimosis, etc.

l) Factores ambientales.

Baja humedad ambiental, las altas temperaturas, o actividades laborales relacionadas con la baja frecuencia de parpadeo, como el uso de pantallas de ordenador, pueden causar SOS leve o agravar el ya existente.

m) Lentes de contacto (LDC).

El 43% de los usuarios de LDC presentan síntomas de ojo seco y el 28%, muestra síntomas moderados-graves (60).

### 2.3.3.B. Clasificación fisiopatológica

La alteración de la superficie ocular es consecuencia del descenso en la producción de lágrima, lo que se conoce como OSAD o de la evaporación lagrimal excesiva, denominada OSE. Ambas circunstancias coexisten a menudo.

#### 2.3.3.B.1. Ojo seco acuo-deficiente (OSAD).

Los pacientes afectos de OSAD se dividen entre aquellos afectos de síndrome de Sjögren y aquellos que no lo están.

##### a) Síndrome de Sjögren.

En estos enfermos se produce una infiltración linfocítica de las glándulas exocrinas y mucosas que da lugar a una disminución secundaria de la secreción, produciendo alteraciones en la película lagrimal y enfermedad de la superficie ocular. Las principales manifestaciones son la queratoconjuntivitis *sicca* y la xerostomía.

- Síndrome de Sjögren primario.

Para el diagnóstico de síndrome de Sjögren se requieren cuatro de los seis criterios mencionados, incluyendo obligatoriamente al menos uno de los dos últimos. Criterios clasificatorios del síndrome de Sjögren del Consenso Europeo-Americano, 2002 (76):

- Síntomas orales (una respuesta positiva):
  - Sensación de boca seca por un período superior a 3 meses.
  - Parotidomegalia recurrente.
  - Necesidad constante de beber líquidos.
- Síntomas oculares (una respuesta positiva):
  - Sensación de ojos secos por un período

superior a 3 meses.

- Sensación de arenilla ocular recurrente.
- Utilizar lágrimas artificiales más de tres veces al día.
- Signos oculares (una prueba positiva):
  - Prueba de Schirmer inferior o igual a 5 mm a los 5 min.
  - Puntuación de 4 o más en la escala de van Bijsterveld en la tinción con rosa de Bengala.
- Alteración de las glándulas salivales (una prueba positiva):
  - Gammagrafía parotídea con déficit difuso de captación.
  - Sialografía con alteraciones difusas ductales y acinares.
  - Flujo salival sin estimular de 1,5 ml o menos en 15 min.
- Histopatología.

Biopsia salival grado 3-4 de la clasificación de Chisholm y Mason.
- Inmunología (una prueba positiva):
  - Anti-Ro/SS-A.
  - Anti-La/SS-B.

\* Se consideran criterios de exclusión de síndrome de Sjögren primario:

- Irradiación previa al diagnóstico de cabeza y cuello.
- Infección por el VHC.
- SIDA.
- Linfoproliferación previa.
- Sarcoidosis.
- EICH.
- Consumo de drogas colinérgicas.

- Síndrome de Sjögren secundario.

Se asocia con otras enfermedades autoinmunes subyacentes:

- Otras enfermedades autoinmunes sistémicas
  - Lupus eritematoso sistémico.
  - Artritis reumatoide.
  - Esclerodermia.
  - Policondritis recidivante.
  - Enfermedad mixta del tejido conectivo.
  - Miopatías inflamatorias.
  - Enfermedad de Still del adulto.
  - Sarcoidosis.
- Enfermedades autoinmunes organoespecíficas
  - Cirrosis biliar primaria.
  - Miastenia grave.
- Infecciones virales crónicas
  - Infección por VIH.
  - Infección por el virus de la hepatitis C.
- Otros procesos.

b) Sin síndrome de Sjögren.

- Hiposecreción lagrimal relacionada con la edad.
- Destrucción, ausencia o reducción de tejido lagrimal (tumor, inflamación, cirugía, agenesias, ...).
- Enfermedades cicatrizales: penfigoide, síndrome de Stevens-Johnson, quemaduras, tracoma.
- Lesiones neurológicas: Parkinson, síndrome de Riley-Day, sensación corneal reducida tras cirugía refractiva o uso de LDC.
- Hipovitaminosis A

2.3.3.B.2. Ojo seco evaporativo (OSE).

Las causas principales del OSE son:

a) Disfunción de las glándulas de Meibomio (DGM)

- Definición: Alteración crónica y difusa de las glándulas de Meibomio,

normalmente caracterizada por la obstrucción de los conductos terminales y/o cambios cualitativos/cuantitativos en la secreción glandular. Esto puede resultar en una alteración de la película lagrimal, síntomas de irritación ocular, inflamación clínicamente aparente y enfermedad de la superficie ocular (77).

- Clasificación: Las DGM pueden clasificarse según su secreción en de baja producción (*sicca meimobiana*) o de alta producción (*seborrea meimobiana*). Ambas pueden ser primarias o secundarias a una patología ocular o sistémica.
- Fisiopatología: Independientemente del mecanismo etiológico, la consecuencia final de la DGM es la baja secreción de lípidos procedentes de las glándulas de Meibomio. Esta carencia ocasiona alteraciones en la capa lipídica externa de la película lagrimal, lo que puede ocasionar la evaporación, hiperosmolaridad y la inestabilidad de la misma, así como aumentar el número de bacterias en el borde palpebral (77). Podemos describir DGM en patologías oculares muy frecuentes tales como blefaritis posterior, rosácea y queratoconjuntivitis atópica.
- La DGM parece ser la causa principal de SOS en todo el mundo (60, 77, 78). El *International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction* señala que tradicionalmente se han empleado los términos “blefaritis posterior” y DGM como si fueran sinónimos, pero que dichos términos no son intercambiables (78). El término blefaritis posterior se emplea para describir condiciones inflamatorias del borde posterior del párpado, de las cuales la DGM es solo una posible causa. El término meibomitis/meibomiamitis designaría una DGM con componente inflamatorio, lo que no siempre ocurre.

#### b) Uso de LDC.

Incrementan la osmolaridad al aumentar la evaporación lagrimal. Parece que la hipoestesia corneal secundaria que produce su uso continuado también puede contribuir en el proceso (79).



c) Factores ambientales.

La baja humedad ambiental, las altas temperaturas o actividades laborales relacionadas con la baja frecuencia de parpadeo, como el uso de pantallas de ordenador.

d) Alteraciones palpebrales.

Aumento de tamaño de la apertura palpebral (exoftalmos) o la mala congruencia párpado/globo ocular, lagoftalmos, baja frecuencia de parpadeo o parpadeo defectuoso.

e) Interacciones con los componentes preservativos de fármacos tópicos.

### 2.3.3.C. Fisiopatología del síndrome de ojo seco

Tanto el OSAD como el OSE pueden ocasionar inestabilidad de la película lagrimal y aumento de su osmolaridad, lo que altera la homeostasis de la superficie ocular. La osmolaridad normal se estima que está en  $302 \pm 9,7$  mOsm/l (60). El punto de corte más aceptado es  $> 316$  mOsm/l (34). La medida de la osmolaridad lagrimal se considera una de las mejores pruebas para el diagnóstico del SOS y se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (80).

Sea por la secreción insuficiente o por la evaporación excesiva, la capa acuosa de la lágrima disminuye, por lo que los solutos presentes en ella se concentran, aumentando la osmolaridad. Este incremento ocasiona, por un lado, que la células del epitelio corneal liberen agua para contrarrestar el aumento de solutos de la lágrima, lo que puede conducir al estrés osmótico y, finalmente, a la apoptosis celular (81, 82). El daño de las células epiteliales estimula las terminaciones nerviosas, lo que a su vez ocasiona la pérdida de la señalización nerviosa en la glándula lagrimal, menor secreción lagrimal refleja y disminución de la sensibilidad corneal, agravando por un lado el déficit lagrimal y estimulando la inflamación, por otro (60).

En la inflamación de la superficie ocular secundaria a la osmolaridad y la apoptosis celular (81-86), se superponen, de manera aún no filiada del todo, alteraciones hormonales, neurológicas e inflamatorias. En este proceso inflamatorio crónico se infiltran los tejidos MALT (conjuntiva y glándulas lagrimales) por parte

Aunque no se conoce con certeza el mecanismo exacto, la hiperosmolaridad de la superficie ocular podría causar sobre-expresión del HLA DR y la acción de las células presentadoras de antígeno de la conjuntiva que, mediante la acción de citocinas pro-inflamatorias, activarían de manera masiva y progresiva a los linfocitos (sobre todo LTCD4 y LNK). Éstas, a su vez, reclutarían más células inmunes y activarían la secreción de más citocinas pro-inflamatorias en la conjuntiva y en las glándulas lagrimales, entre las cuales se encuentran las interleukinas (IL) IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7I, L-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , y la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) (60,85,86). Se ha correlacionado la población celular positiva para HLA DR con la gravedad del ojo seco (87). Asimismo, se han hallado concentraciones más elevadas de citocinas y quemocinas inflamatorias, especialmente IL-1 $\beta$ , IL6, IL8, IL-10, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , en las lágrimas de pacientes con SOS, comparado con la de controles (88). Sin embargo, dada la diversidad de perfiles de moléculas proinflamatorias detectadas en las muestras de los pacientes con SOS, no es sencillo establecer una correlación entre una citocina/quemocina concreta y la presencia/gravedad de la enfermedad. Por otro lado, la hiperosmolaridad y la inflamación de la superficie ocular también causan la pérdida de células caliciformes (60). Este ciclo se conoce como “el círculo vicioso del ojo seco” (ver figura 1). No importa cómo se inicie el ciclo, una vez que se establece de manera crónica conduce a un SOS, que puede ocasionar daños graves en la superficie ocular si no se instaure un tratamiento correcto a tiempo (89).



Figura 1. Fisiopatología del ciclo del ojo seco. Modificada de Baudouin (89).

### 2.3.3.D. Clasificación según estadio de gravedad

El DEWS clasifica el SOS en cuatro estadios (24), de menor a mayor gravedad:

#### a) Nivel 1

Molestias leves o esporádicas, a menudo en respuesta a estímulos ambientales, con o sin síntomas visuales. Signos leves, si los hubiera, de hiperemia conjuntival, tinción de la superficie ocular o enfermedad palpebral. La estabilidad de la lágrima, medida mediante test de rotura lagrimal, y la producción de la misma, medida mediante test de Schirmer, quedan afectadas de forma variable (ver el epígrafe 3.5, “Diagnóstico del ojo seco”, para definición del test de rotura lagrimal y el test de Schirmer).

#### b) Nivel 2

Molestias leves y síntomas visuales intermitentes con o sin exposición a estímulos que los provoquen; más frecuentemente muestran tinción corneal o conjuntival, así como secreción leve. Puede aparecer enfermedad palpebral y la estabilidad y producción de la lágrima suele quedar afectada. El test de Schirmer presenta valores entre 6-10 mm y el test de rotura lagrimal, entre 6-10 segundos. Es un grado de SOS moderado.

#### c) Nivel 3

Síntomas frecuentes o constantes sin provocación o síntomas visuales que pueden limitar las actividades. Tinción moderada de la superficie ocular (corneal y

conjuntival). La enfermedad palpebral es común y la estabilidad y producción de la película lagrimal suelen estar considerablemente reducidas. Frecuentemente se asocia con disfunción glandular de Meibomio. El test de Schirmer presenta valores entre 3-5 mm y el test de rotura lagrimal, entre 3-5 segundos. Es un grado de SOS severo.

d) Nivel 4

Síntomas constantes e incapacitantes. Marcada enfermedad palpebral a menudo presente. Inyección conjuntival marcada. Tinción córneo-conjuntival  $> 2/3$  con densidad de tinción elevada. Tasa de producción lagrimal mínima. El test de Schirmer presenta valores  $\leq 2$  mm y el test de rotura lagrimal,  $\leq 2$  segundos. Es un grado de SOS muy severo.

Grado severidad	1	2	3	4
<b>Síntomas</b>	Leves y esporádicos. Desencadenados por factores ambientales	Moderados, esporádicos o crónicos. No necesariamente desencadenados por factores ambientales	Severos, constantes o frecuentes. No precisan desencadenante ambiental	Severos, constantes e incapacitantes
<b>Alteraciones visuales</b>	Ninguno o fatiga esporádica	Limitan esporádicamente actividades cotidianas	Crónicos. Limitan actividades cotidianas	Constantes y, en ocasiones, incapacitantes
<b>Inyección conjuntival</b>	Ausente o leve	Ausente o leve	+/-	+/++
<b>Tinción córneo-conjuntival</b>	Ausente o leve	Variable	Moderada o severa	Severa
<b>BUT (seg)</b>	Variable	6-10	3-5	$\leq 2$
<b>Test de Schirmer (mm/5 min)</b>	Variable	6-10	3-5	$\leq 2$
<b>DGM</b>	Variable	Variable	Frecuente	Frecuente
<b>Otros</b>	-	Disminución menisco lagrimal	Queratitis filamentosa, acúmulos de moco, aumento de detritus.	Lo anterior más: ulceración, triquiasis, queratinización, simbléfaron.

Tabla 1. Clasificación ojo seco según sintomatología. Modificado DEWS (24). DGM: Degeneración de las glándulas de Meibomio; BUT: Tiempo de rotura lagrimal.

## 2.4. Impacto del ojo seco

El SOS es una patología crónica muy frecuente que ocasiona pérdida de calidad de vida a los pacientes afectados, así como un efecto notable en el gasto farmacéutico de los países. Por tanto, se trata de un problema destacado de salud pública.

Plugefelder (90) pone de manifiesto que el ojo seco altera la realización de muchas actividades no necesariamente relacionadas con la visión, ya sean de tipo social, laboral o cotidianas. Asimismo señala que el impacto económico del SOS es destacado, y se deriva tanto de los costes directos (consultas, prescripción de medicamentos, lentes especiales, humidificadores, procedimientos quirúrgicos), indirectos (absentismo y baja productividad laboral, cambio de trabajo) e intangibles (reducción en la calidad de vida, afectación del tiempo libre, alteración en la vida social, física y emocional).

Friedman (91), por su parte, apunta que en los pacientes con ojo seco se afecta de manera importante la agudeza visual funcional, es decir, aquella que se alcanza tras mantener los ojos abiertos y que perjudica la realización de tareas tan necesarias como la lectura, la conducción o el trabajo con ordenador. Basándose en análisis farmaco-económicos cifra en 6.500 dólares americanos la reducción de la productividad por persona y año (datos de 2007).

Shiffman (92), realizó un estudio de coste-utilidad en el que evaluó el impacto del ojo seco en la calidad de vida de los pacientes. Los pacientes afectados de SOS moderado afirmaban que éste tenía mayor impacto sobre su calidad de vida que patologías como la psoriasis o la ceguera monocular. Los pacientes con ojo severo cifraban la reducción de la calidad de vida en el mismo plano que el de la angina de pecho inestable, la insuficiencia renal tratada con diálisis o una fractura cadera incapacitante.

## 2.5. Diagnóstico del ojo seco

El diagnóstico preciso del SOS mediante pruebas complementarias presenta dificultades debido a que:

- a) No existe en la actualidad ninguna prueba complementaria considerada *Gold Standard* que por sí misma permita diagnosticar el síndrome.
- b) Ningún cociente permite ponderar la importancia de dichas pruebas complementarias, ya que el SOS presenta etiologías y patofisiologías variadas: distintos tests objetivos analizan los diversos aspectos de la fisiología lagrimal (93).
- c) No se han establecido puntos de corte claros a partir de los cuales las pruebas complementarias existentes se consideran patológicas (94).
- d) Existe una baja reproducibilidad de las pruebas objetivas, ya que el sistema lagrimal es cambiante y sus componentes son interdependientes.
- e) No existe concordancia entre las pruebas objetivas y los síntomas (95).

Por otro lado, existe un componente subjetivo, la sintomatología, que es de crucial importancia en el ojo seco y se evalúa mediante cuestionarios. La combinación de todas estas pruebas nos permite diagnosticar el SOS.

## 2.5.1 Pruebas complementarias

### 2.5.1.A. Tiempo de rotura lagrimal.

El tiempo de rotura lagrimal (TRPL) o BUT (Break-Up Time), descrito por Norm en 1969, se define como el intervalo de tiempo transcurrido entre un parpadeo y la primera aparición de un islote de desecación en la superficie corneal. Se trata de un test cualitativo que estima la calidad de la lágrima (es un buen indicador de la inestabilidad de la película lagrimal, pero no aclara cuál es el factor deficitario). Es anormal en el SOS tipo OSE, siendo la DGM una causa frecuente.

Se suele realizar instilando una gota de fluoresceína sódica al 2% (Fluotest, 2.5 mg de fluoresceína sódica y 4 mg de oxibuprocaina clorhidrato por ml) en el fondo de saco conjuntival inferior. Después de eliminar el exceso de colorante, se pide al paciente que parpadee y se espera un minuto para que la fluorescencia del producto sea mayor. Mediante exploración en lámpara de hendidura con luz azul cobalto se mide el tiempo transcurrido entre el último parpadeo y la aparición de islotes de hipofluorescencia o irregularidades de ésta en la superficie corneal. El tiempo normal de rotura de la película lagrimal debe ser > 10 segundos. La

aparición de islotes de desecación corneal antes de los 10 segundos se considera patológica. En los últimos años Abelson et al (96) han propuesto la reducción del nivel de corte a  $\leq 5$  segundos. No obstante, actualmente no se dispone de suficientes datos para apoyar este cambio de criterio (34).

#### 2.5.1.B. Test de Schirmer.

Es la prueba clásica para el diagnóstico del ojo seco. El test de Schirmer es un método cuantitativo de estimación de la secreción glandular lagrimal. Sus diversas formas, así como las distintas variantes introducidas para la realización de este test, tratan de medir la producción lagrimal tanto basal como refleja. Se afecta sobre todo en casos de ojo seco acuodeficiente (OSAD).

Durante la exploración no debe haber luces fuertes ni corrientes de aire. A los 5 minutos se retira la tira y se anotan los milímetros lineales humedecidos en la parte no introducida. Los pacientes deben ser explorados siempre en la misma habitación, con luz tenue, una temperatura de unos 25° C y humedad aproximada del 40%. Existen tres modalidades:

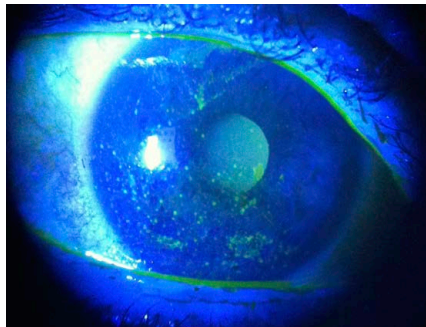
1. Schirmer tipo I sin anestesia: Mide la secreción basal y refleja. Se considera normal un valor  $> 10$  mm de la tira.
2. Schirmer tipo I con anestesia: La prueba mide la secreción basal incrementada por el reflejo trigeminal naso-lacrimal. Se considera normal un valor  $> 6$  mm de la tira.
3. Schirmer tipo II (con estimulación nasal): Mide la secreción basal y refleja máximas. Es de gran utilidad a la hora de distinguir entre pacientes con síndrome de Sjögren de aquéllos sin síndrome de Sjögren. En los pacientes no Sjögren presentan un considerable aumento secretorio lagrimal tras la estimulación nasal, mientras que casi no hay cambios secretorios en los pacientes con Síndrome de Sjögren.

#### 2.5.1.C. Tinción corneo-conjuntival.

Para valorar las características histopatológicas de la superficie ocular se emplean diversos colorantes: fluoresceína, rosa de Bengala y verde lisamina. Cada una de estas tinciones presenta apetencias tisulares diferentes.

- **Fluoresceína.**

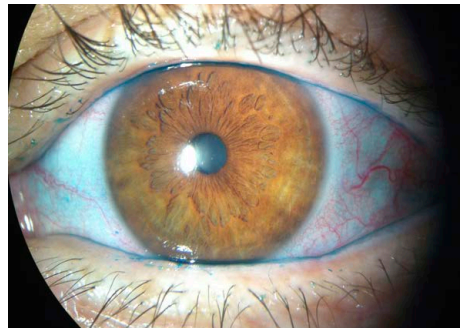
Se fija a las membranas basales tiñendo las células epiteliales que presentan membranas celulares dañadas o abrasiones corneales. Por lo tanto sirve para observar defectos epiteliales y áreas en las que las estructuras de unión intercelulares están dañadas (97). Se instila una gota de fluoresceína sódica al 2% (Fluotest, 2.5 mg de fluoresceína sódica y 4 mg de oxibuprocaina clorhidrato por ml) en el fondo de saco conjuntival inferior. Tras 2 minutos de la instilación se evalúa el grado de tinción de la córnea y de la conjuntiva con luz azul cobalto. (Figura 2).



*Figura 2. Fotografía del polo anterior con tinción corneal con fluoresceína.*

- **Rosa de Bengala y verde de lisamina.**

Muestran las zonas donde no existe epitelio corneal o éste está alterado. El rosa de Bengala, repelido por la mucina de la película lagrimal, tiñe las células degeneradas, al igual que el verde lisamina, y las células viables, no afectadas por esa tinción. Se utilizan para visualizar defectos mucínicos indistintamente ya que ambas presentan el mismo patrón de tinción (34). El verde de lisamina es mejor tolerado, por lo que se emplea más a menudo. (Figura 3).



*Figura 3. Fotografía del polo anterior con tinción córneo-conjuntival con verde de lisamina.*

Las tinciones ayudan a diferenciar los pacientes con SOS tipo OSAD



(tinción en línea media nasal, temporal y corneal), con el lagoftalmos (tinción inferior), con la queratoconjuntivitis límbica superior (tinción superior), con la disfunción de glándulas de Meibomio (puede no dar tinción o ser mínima) y la blefaritis moderada o grave (la tinción puede invadir casi toda la córnea) (97).

Para la evaluación de estas tinciones se dispone actualmente de dos métodos: el método de Oxford (97), empleado normalmente para la tinción con fluoresceína y el método de van Bijsterveld (98) para el verde de lisamina y el rosa de Bengala:

- La tinción, según el esquema de Oxford, divide en seis grados la zona de la córnea y la conjuntiva, numerados del 0 al 5 (figura 4).

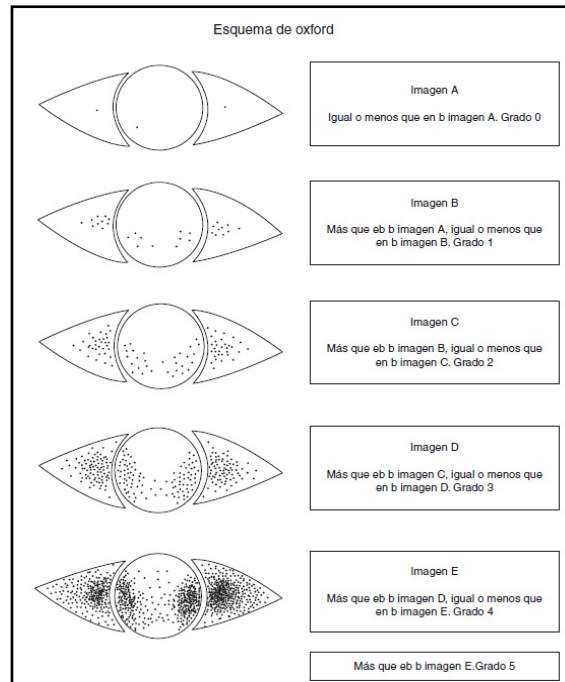


Figura 4. Escala de Oxford.

- La puntuación de van Bijsterveld (figura 5) divide la superficie ocular en tres áreas (conjuntiva nasal, córnea y conjuntiva temporal) y se puntúa la tinción de cada una de ellas del 0 a 3, considerando valor 0 la ausencia de puntos impregnados, 1 presencia de algunos puntos impregnados, 2 zonas impregnadas bien definidas y 3 impregnación total. La puntuación global corresponde a la suma de las 3 áreas. Una puntuación  $\geq 3,5$  se considera como patológica.

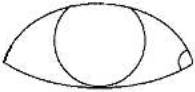
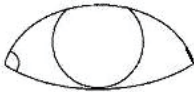
OD			OI		
Conjuntiva temporal	Córnea	Conjuntiva nasal	Conjuntiva nasal	Córnea	Conjuntiva temporal
A	B	C	C	B	A
					
A	B	C	C	B	A
0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Puntuación total = A+B+C =			Puntuación total = C+B+A =		

Figura 5. Escala de van Bijsterveld.

#### 2.5.1.D. Citología de impresión conjuntival.

La citología de impresión de la conjuntiva es una técnica no invasiva que permite determinar el grado de metaplasia escamosa de la superficie conjuntival. Fue utilizada por primera vez por Egbert (99), siendo modificada posteriormente por otros autores de acuerdo con sus necesidades. Hay varios criterios de graduación de la metaplasia escamosa basados en parámetros morfológicos o morfométricos (100).

La citología de impresión de la superficie ocular se realiza con anestesia tópica de la córnea y conjuntiva mediante instilación de una gota de colirio anestésico, normalmente hidrocloreuro de tetracaína y oxibuprocaina (Colircusí Anestésico Doble, Alcon Cusí SA). A continuación, con una pinza se toma una tira de papel de filtro de acetato de celulosa (Millipore HAWP304) y se coloca sobre la superficie ocular que deseamos estudiar, sobre la que se comprime suavemente durante unos segundos con la parte plana de la pinza, y se retira el papel de filtro, que arrastrará pegadas a él una o dos capas superficiales del epitelio conjuntival y una sola capa del epitelio corneal. Se suelen realizar tomas de varias áreas -p. ej., conjuntiva bulbar subpalpebral superior, conjuntiva bulbar expuesta (trígonos conjuntivales medial y lateral), conjuntiva bulbar subpalpebral inferior y centro de la córnea-, para analizar la mayor parte de la superficie ocular. Las tiras se fijan en etanol 96% y se tiñen con ácido peryódico de Schiff (PAS) y hematoxilina, deshidratada en grados ascendentes de etanol. Después se colocan en xilol para completar la deshidratación y aclarar el papel de filtro, y por último se colocan permanentemente en resina tipo Entellan con un cubre-portaobjetos (100).

Una vez teñidas las muestras se analizan mediante microscopio óptico, observando el número de células epiteliales conjuntivales mucosecretoras (células

caliciformes) así como al área del citoplasma y núcleo de las células no-secretoras, las alteraciones y tinción citoplásmicas, las alteraciones nucleares y la relación entre las áreas nucleares y citoplásmicas (ratio N:C). Para la medida de las áreas puede usarse un planímetro de imagen o bien mediante estimación subjetiva. La determinación cuantitativa de células caliciformes se hace con una rejilla calibrada sobre fotografías realizadas al mismo aumento y tamaño, directamente con el microscopio o sobre las fotografías antes mencionadas utilizando un objetivo con aumento x 40 (100).

El grado de metaplasia escamosa evalúa el estado de la superficie ocular, correlacionándose directamente a la gravedad de la enfermedad. En el OSAD el grado de metaplasia escamosa es mayor que en el OSE (101). En el microscopio se analizan las alteraciones en las células epiteliales, caliciformes e inflamatorias, teniendo en especial consideración (101): la densidad de las células caliciformes (menor conforme mayor es la metaplasia), el tamaño y la forma de las células epiteliales no secretoras (que incrementan su tamaño conforme aumenta la metaplasia), las alteraciones en el citoplasma y el núcleo de las células caliciformes, la relación núcleo-citoplasma de las células epiteliales (su aumento indica mayor gravedad), la separación entre las células y la aparición de queratinización.

En la tabla 2 se resumen las características de los cinco grados de la escala de Nelson, que clasifican en seis grados (0-5) el grado de metaplasia escamosa de las células epiteliales de conjuntiva y córnea, de menor a mayor afectación.

	Conjuntiva	Córnea	Células córneo-conjuntivales
<b>Grado 0</b>	Densidad células caliciformes > 400 células/mm <sup>2</sup> , citoplasma PAS positivo.	Área celular 300-350 μm <sup>2</sup> , ratio N:C 1:3.	Unidas, citoplasma eosinófilo, núcleo redondo y sin alteraciones.
<b>Grado 1</b>	Densidad células caliciformes 300-400 células/mm <sup>2</sup> , citoplasma PAS positivo, células epiteliales no secretoras área 200-350 μm <sup>2</sup> , ratio N:C de 1:3 a 1:4.	Área celular 300-400 μm <sup>2</sup> , ratio N:C 1:4.	Unidas, pero a veces aparecen algo separadas, citoplasma eosinófilo, núcleo normal.
<b>Grado 2</b>	Densidad células caliciformes 200-300 células/mm <sup>2</sup> , citoplasma PAS positivo, células epiteliales no secretoras área 350-500 μm <sup>2</sup> , ratio N:C 1:5.	Área celular 300-400 μm <sup>2</sup> , ratio N:C 1:4.	Algo separadas, citoplasma eosinófilo, ocasionalmente binucleadas.

<b>Grado 3</b>	Densidad células caliciformes 50-200 células/mm <sup>2</sup> , citoplasma débilmente PAS positivo, células epiteliales no secretoras área 500-900 μm <sup>2</sup> , ratio N:C 1:10.	Área celular 1.000-1.800 μm <sup>2</sup> , ratio N:C 1:15.	Frecuentemente aisladas, citoplasma metacromático, núcleo alterado (binucleado, picnótico o anucleado).
<b>Grado 4</b>	Densidad células caliciformes 10-50 células/mm <sup>2</sup> , citoplasma PAS negativo, células epiteliales no secretoras área 900-1.600 μm <sup>2</sup> , ratio N:C 1:20.	Área celular 1.800-2.500 μm <sup>2</sup> , ratio N:C 1:20.	Aisladas, citoplasma basófilo, débil queratinización, núcleo picnótico o ausente.
<b>Grado 5</b>	Densidad células caliciformes < 10 células/mm <sup>2</sup> , células epiteliales no secretoras área > 1.600 μm <sup>2</sup> , ratio N:C 1:30.	Área celular > 2.500 μm <sup>2</sup> , ratio N:C 1:30.	Aisladas, queratinizadas, citoplasma basófilo, núcleo lítico o ausente.

Tabla 2. Escala de Nelson. Tomado de Murube (100). Ratio N:C: relación núcleo - citoplásmica.

### 2.5.1.E. Otros métodos diagnósticos

- Aclaramiento lagrimal y fluorimetría.

El test de aclaramiento lagrimal consiste en la observación de la desaparición progresiva de fluoresceína tras su aplicación en el fondo de saco inferior (34). Algunos tipos de ojo seco presentan un aclaramiento disminuido, por ejemplo pacientes ancianos, DGM o alteraciones neurotróficas (102). En el SOS existe una tasa de recambio disminuida, definida como concentración de fluoresceína en lágrima por minuto después de la instilación. El aclaramiento lagrimal presenta mayor correlación con los síntomas que el test de Schirmer (102).

La fluorimetría se realiza empleando un instrumento denominado fluorofotómetro y cuantifica por un lado el daño del epitelio corneal y por otro, el aclaramiento lagrimal mediante la medición la concentración de fluoresceína en la lágrima.

- Meniscografía.

La meniscografía capilar es un método no invasivo con el que se valora el volumen de lágrima, a través de la estimación del menisco lagrimal con la lámpara de hendidura o bien mediante medición del radio de curvatura con la ayuda de un sistema de proyección y análisis de imágenes. El radio del menisco lagrimal disminuye en pacientes con ojo seco.

- Medida de la osmolaridad lagrimal.

La osmolaridad normal se estima en  $302 \pm 9,7$  mOsm/l (60). La hiperosmolaridad lagrimal del SOS es una de las causas de la inflamación

crónica y el daño a la superficie ocular y está presente tanto en el SOS tipo OSAD como OSE. El punto de corte más aceptado es  $> 316$  mOsm/l (34). La hiperosmolaridad de la lágrima causa un “estrés osmótico” a la superficie ocular que ocasiona inflamación crónica, alteración en las células epiteliales y una disminución de las células caliciformes, por lo que se afecta la calidad y estabilidad de la película lagrimal (83-89). La medida de la osmolaridad lagrimal se considera una de las mejores pruebas para el diagnóstico del SOS y se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (80). Existen varios tipos de osmómetros disponibles.

- Topografía corneal.

Un topógrafo corneal dotado de un dispositivo específico permite medidas cuantitativas de la regularidad de la película lagrimal. El índice de regularidad de la superficie se correlaciona con pruebas convencionales tales como la tinción de fluoresceína y la visión borrosa existentes en el ojo seco. Los pacientes con SOS presentan paquimetrías corneales inferiores a la media, probablemente a causa de la osmolaridad aumentada de la película lagrimal (101).

- Interferometría.

La capa lipídica de la película lagrimal produce un fenómeno de interferencia con la luz que origina imágenes especulares de la superficie ocular, que pueden ser captadas mediante interferómetros comerciales (101).

- Test de normalización de la película lagrimal.

Se realiza midiendo agudeza visual lejana no corregida, antes y después de la instilación de una gota de carboximetilcelulosa 0,5% (101). En los pacientes con SOS la agudeza visual mejora tras la aplicación, mientras que en los pacientes no afectados no hay variación.

- Índice de función lagrimal.

Se calcula mediante el cociente entre el valor del test de Schirmer y el test de aclaramiento (103). Este índice permite obtener, por la combinación de los componentes secreción y drenaje, una evaluación de la dinámica lagrimal.

- Estesimetría.

La sensibilidad corneal se puede valorar al pasar una hebra de algodón sobre la córnea. Para mediciones más exactas se utilizan los estesiómetros, siendo el más empleado el de Cochet Bonet.

- Determinación de componentes lagrimales.

A pesar de las dificultades técnicas para realizar determinaciones de moléculas en la lágrima, ya que la muestra es escasa, se está avanzando en el aislamiento de las moléculas alteradas en el ojo seco y otras patología ocular:

- La disminución de la concentración de lactoferrina indica disminución de la secreción acuosa.
- La lisozima es una enzima con acción bacteriolítica producida por la glándula lagrimal principal y accesoria. En el SOS tipo OSAD se encuentra disminuida, mientras que en el tipo OSE su concentración se halla normal o aumentada (101).
- Los niveles de eoxantina y de inmunoglobulina E están elevados en las afecciones alérgicas.
- Las lipocalinas, la fosfolipasa A o los ácidos grasos insaturados, así como mediadores de la inflamación, probablemente aporten nuevos datos y perfiles bioquímicos para el diagnóstico del SOS (34).
- Las citocinas, así como las células HLA positivas podrían emplearse en un futuro como biomarcadores para el diagnóstico del SOS (85, 86).

Existen otras pruebas menos accesibles, que se realizan en el contexto de la investigación experimental, como el análisis del ritmo de evaporación lagrimal, la termografía, la microscopía confocal, la meibomiografía...

### 2.5.2. Síntomas clínicos de ojo seco

Los pacientes afectados de ojo seco refieren habitualmente enrojecimiento ocular y del borde palpebral; párpados inflamados que pueden estar acompañados de escamas o espuma. Se despiertan con los ojos pegados. Presentan secreciones o sequedad. Sensación de arenilla, cuerpo extraño, picor, pinchazos quemazón o malestar en el ojo. Experimentan lagrimeo, ojos llorosos, fotofobia o visión borrosa transitoria o bien notan los ojos y los párpados cansados o con sensación de pesadez (104). También describen una mayor sensibilidad a viento, humo, polvo o productos cosméticos. Los factores ambientales (aire acondicionado, climas secos, trabajo con ordenador) empeoran los síntomas. Interesa conocer también si los síntomas se modifican a lo largo del día o mediante el uso de humectantes u otros tratamientos.

### 2.5.3. Cuestionarios

Los signos y síntomas de ojo seco a menudo no correlacionan bien, pero los síntomas se consideran importantes en el diagnóstico y tratamiento del ojo seco. La sintomatología del ojo seco tiende a ser inespecífica y repleta de matices en ocasiones difíciles de expresar y que suelen superponerse. Para caracterizar los síntomas de la manera más sistemática posible y emplearlos para medir la efectividad de las diversas intervenciones y facilitar su reproducibilidad, se han elaborado cuestionarios específicos.

Los tres cuestionarios validados más conocidos para el ojo seco son: el elaborado por Donate (104), el cuestionario de ojo seco de McMonnies (105) y el OSDI (*Ocular Surface Disease Index*) (106). Formulan preguntas sencillas sobre diferentes aspectos de la enfermedad, ya sea acerca de la severidad (nula, leve, moderada, severa, muy severa) o la frecuencia (nunca, raramente, algunas veces, con frecuencia, todo el tiempo) de los síntomas más comunes.

Para el presente trabajo se empleó el cuestionario validado de Donate (104).

Preguntas:

- Enrojecimiento ocular
- Borde de párpado inflado
- Escamas o costras en párpados
- Ojos pegados al levantarse
- Secreciones (legañas)
- Sequedad de ojo
- Sensación de arenilla
- Sensación de cuerpo extraño
- Ardor/Quemazón
- Picor
- Malestar de ojos
- Dolor agudo (pinchazos en los ojos)
- Lagrimeo
- Ojos llorosos
- Sensibilidad a la luz (fotofobia)
- Visión borrosa transitoria que mejora con parpadeo
- Cansancio de ojos o párpados
- Sensación de pesadez ocular o palpebral

Cada uno de estos síntomas se clasificará según la gravedad que tuvo durante la última semana según la siguiente escala:

0. No tiene ningún síntoma.
1. Pocas veces tiene este síntoma.
2. A veces tiene ese síntoma pero no le molesta.
3. Frecuentemente tiene ese síntoma, le molesta, pero no interfiere en sus actividades.
4. Frecuentemente tiene ese síntoma, le molesta e interfiere en sus actividades.

Tabla 3. Cuestionario validado de Donate (104).

## 2.6. Tratamiento del ojo seco

El ojo seco generalmente no tiene cura, por lo tanto, el tratamiento se estructura en torno al control de los síntomas y la prevención del daño de la superficie. Existen cuatro tipos de intervenciones (107):

- La sustitución lagrimal (básicamente el empleo de lágrimas artificiales y lubricantes).
- La preservación lagrimal mediante la oclusión del sistema de drenaje lagrimal.
- La estimulación farmacológica del proceso de lagrimeo (empleo de sustancias secretagogas).
- El tratamiento de las causas etiológicas de la enfermedad (inmunosupresores, antibióticos, hormonas sexuales, hemoderivados...).

La elección del tratamiento depende de la severidad de la patología de la superficie ocular. El Subcomité nombrado por el Taller Internacional sobre el Ojo Seco (24), formuló las siguientes recomendaciones terapéuticas.

### 2.6.1. Ojo seco grado 1

- Modificaciones ambientales.

Evitar ambientes secos y cálidos, uso de humidificadores y recomendaciones para los pacientes que trabajan con ordenadores (condiciones ergonómicas, iluminación adecuada, descansos periódicos, estar debidamente refraccionados). Pueden padecer el “síndrome ocular de pantallas de visualización”. Se recomienda la higiene palpebral diaria en pacientes con DGM.

- Uso de lentes de contacto (LDC).

El problema principal en el uso de LDC es la limitación del paso del oxígeno a través de la lágrima que la superficie corneal necesita para su normal funcionamiento. Existen LDC elaboradas a partir de diversos tipos materiales, cada uno con distinta permeabilidad al oxígeno. Las lentes rígidas permeables al gas presentan el mejor índice de permeabilidad al oxígeno. La hipoxia secundaria al uso continuado de LDC provoca que la



córnea adopte metabolismo anaerobio y acidosis láctica, que inhibe la barrera normal y los mecanismos de bomba de la córnea (79). Se producen así diversas alteraciones corneales en las células epiteliales y endoteliales, disminución de células caliciformes conjuntivales, edema, hipoestesia, vascularización periférica, alteraciones lagrimales y cambios en la flora microbiana (109).

- Cirugía refractiva.

La cirugía refractiva, especialmente el LASIK (acrónimo de *Laser-Assisted in Situ Keratomileusis*) se ha popularizado en los últimos tiempos. La técnica implica la sección de las terminaciones nerviosas corneales del plexo nervioso sub-basal y estromal con el objeto de crear el *flap* epitelial. De ahí se deriva una disminución de la sensibilidad corneal, que provoca una disminución del estímulo aferente corneal responsable de la producción acuosa (109). El plexo nervioso se comienza a regenerar a los seis meses tras la cirugía y su densidad alcanza niveles pre-operatorios a los cinco años de la intervención, aunque la conformación del plexo difiere de la preoperatoria (110). La sensibilidad corneal previa se recupera de tres a nueve meses post-intervención (110). Sin embargo, los pacientes usuarios de LDC de larga duración pueden no recuperar nunca una sensibilidad corneal normal (111). Por otro lado, la disminución de la sensibilidad corneal post-LASIK trae aparejada una disminución de la frecuencia del parpadeo y por lo tanto un aumento de la evaporación lagrimal y de la osmolaridad de la misma. Con respecto a las pruebas complementarias para el diagnóstico del SOS tras cirugía refractiva, Toda (112), halló que tanto el test de Schirmer como el aclaramiento de fluoresceína se encontraban disminuidos hasta un año después de la intervención, mientras que el BUT volvía a valores normales a los seis meses.

- Control de medicaciones concomitantes que producen ojo seco.

Antidepresivos, ansiolíticos, antiparkinsonianos, antihistamínicos, anticolinérgicos, antihipertensivos, diuréticos... recogidos en el cuarto punto de la clasificación etiológica de Murube (74).

- Lágrimas artificiales.

A pesar de los avances que se han producido en el entendimiento de la patología del SOS y en su terapéutica, las lágrimas artificiales continúan

siendo el tratamiento más empleado para su tratamiento (113).

La lágrima presenta una composición compleja (agua, sales, compuestos hidrocarbonatos, proteínas y lípidos) y cambiante según las necesidades de la superficie ocular (79). Además, los sustitutivos no pueden reproducir la estructura de la película lagrimal y se administran de manera discontinua, a diferencia de la lágrima natural. Por todo lo anterior, resulta extremadamente difícil conseguir sustitutivos lagrimales eficaces (107).

En la fisiopatología del ojo seco existe una inflamación e hiperosmolaridad patológicas, por lo que para las lágrimas artificiales se han desarrollado de fórmulas iso o hipoosmolares. Asimismo, el pH de la película lagrimal debe permanecer constante para mantener el normal funcionamiento de las células epiteliales (97). Ciertos electrolitos como el potasio, el magnesio, el calcio, así como el bicarbonato como solución tamponadora ayudan a la conservación de la homeostasis de la superficie ocular (113).

Las formulaciones comerciales incluyen a menudo conservantes en sus productos, sobretudo cloruro de benzalconio o el tiomersal, que, paradójicamente, producen alteraciones de la superficie ocular parecidas a los síntomas del ojo seco, como disminución de la estabilidad de la película lagrimal, alteraciones de la barrera epitelial y reacciones de hipersensibilidad (114-116).

Para el SOS leve se emplean las formulaciones más fluidas como los derivados de la celulosa, el alcohol de polivinilo y el cloruro sódico, que lubrican la superficie ocular.

- Ésteres de celulosa.

Son mucílagos con buen tiempo de retención. Algunos de ellos son la hipromelosa, hidroxiethylcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa. La carboximetilcelulosa se fija al epitelio corneal. Están indicados en SOS tipo OSAD (113). Versura (117) encontró una disminución de la tinción patológica con rosa de Bengala en pacientes tratados con hidroximetilcelulosa.

- Povidona y polivinil alcohol.

Son polímeros que, combinados se han demostrado útiles para el tratamiento de patologías conjuntivales, ya que actúan sobre todo ante las alteraciones de las células caliciformes (113).

### 2.6.2. Ojo seco grado 2

- Se emplean lágrimas artificiales sin conservantes ya sea en formato unidosis que no contienen dichos conservantes o bien envases especiales que no los requieren (con filtros de poliamida o polietersulfona) o que poseen conservantes más respetuosos con la superficie ocular (Poliquaternum). Se emplean también formulaciones más espesas, geles o ungüentos.

- Carbómeros y hialuronatos.

Se prefieren en este estadio del ojo seco, ya que contienen sustancias viscosizantes que aumentan el tiempo de permanencia de la lágrima artificial sobre la superficie ocular. Diversos estudios añaden un papel protector de estos compuestos sobre el epitelio de superficie (34).

- Ácido hialurónico.

Es un mucopolisacárido de alto peso molecular que disminuye la evaporación lagrimal, mejora el trofismo corneal y parece regular la respuesta inflamatoria, aunque no se ha hallado una correlación clínica evidente (113, 118).

- Ungüentos.

Los lípidos de la lágrima disminuyen con la evaporación. Forman la capa más externa de la lágrima y son difíciles de sustituir (113). Con objeto reducir la evaporación se emplean preparaciones con parafina y lanolina en forma de ungüentos o pomadas. Actualmente existen en el mercado preparados mixtos, en los que se combinan lípidos y polímeros, con los que se pretende aunar los efectos de ambos compuestos (34).

- Anti-inflamatorios tópicos.

Al existir un mecanismo fisiopatológico inflamatorio crónico subyacente en el SOS, se emplea terapia anti-inflamatoria. En este nivel se recomiendan corticoides tópicos y ciclosporina A al 0'05%.

- Corticoides.

Los corticoides ejercen su actividad anti-inflamatoria mediante la

inhibición de la cascada inflamatoria en varios puntos (34,119): la síntesis de derivados del ácido araquidónico, el reclutamiento de células inmunes, la actividad enzimática de la MMP 9 y de distintas colagenasas. Además, preservan las uniones estrechas del epitelio y disminuyen la descamación celular (116). La aplicación tópica de los mismos provoca una inmunosupresión a nivel local con aplicabilidad clínica en el SOS como ponen de manifiesto diversos estudios en los que se demuestra la mayor capacidad de estos compuestos frente a tratamientos convencionales para reducir tanto los síntomas como los signos de la enfermedad (34,121,122). Pflugfelder encontró mejoría en los signos y síntomas del ojo seco empleando corticosteroides tópicos, así como descenso en los niveles de IL 8 en el epitelio conjuntival (123).

Los corticoides con menor capacidad de penetración en la cámara anterior son los derivados fosfatos, que son los recomendados en este nivel. La máxima penetración y potencia la alcanza el acetato de prednisolona. Su uso prolongado produce efectos secundarios bien conocidos: aumento de la presión intraocular, cataratas, aumento de la susceptibilidad a infecciones y retraso de la cicatrización corneal (119). Por ello, se reservan para las exacerbaciones de los síntomas de ojo seco (107).

- Ciclosporina A al 0'05%.

Inhibe la producción de la IL 2, lo cual disminuye la activación linfocitos CD4 y CD8 y la producción de citoquinas pro-inflamatorias, sin provocar ningún efecto citotóxico directo (119). También aumenta el número de células caliciformes (124,125). La ciclosporina tópica ha demostrado disminuir los síntomas y la enfermedad de la superficie ocular en ensayos clínicos aleatorizados (126), así como disminuir la expresión la IL 6 en el epitelio conjuntival (127).

- Tetraciclinas vía oral.

Además del efecto antibiótico mediante la inhibición de la síntesis de proteínas de la pared bacteriana, las tetraciclinas presentan actividad anti-

inflamatoria y anticolagenolítica (128). La inhibición directa de la síntesis de MMP y de la actividad colagenasa (129,130) así como de la secreción de mediadores de la inflamación como la IL  $I\beta$ , del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (130) y del óxido nítrico (131), son los principales factores que contribuyen a una mejoría clínica en el ojo seco, ya que se reducen los procesos de destrucción de tejido corneal.

Se recomiendan especialmente, aunque no únicamente, en los cuadros asociados a DGM, como úlceras recalcitrantes, blefaritis, flictenulosis, y rosácea (129). Además regulan la presencia de ácidos grasos en la lágrima mediante la inhibición de producción de lipasas bacterianas (132).

- Secretagogos
  - La pilocarpina vía oral en dosis de 20 mg/día se muestra eficaz en el tratamiento síndrome de Sjögren moderado, mejorando los síntomas de ojo seco, aunque resulta más eficaz para la xerostomía (133). Presenta el inconveniente de que no puede emplearse en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, ni en casos de insuficiencia renal ni cardíaca.
  - La cevilemina presenta menos efectos adversos y también mejora la sequedad bucal y ocular en diversos ensayos clínicos (134,135), aunque otros autores encuentran mejoría de los síntomas, pero no en los signos objetivos de ojo seco (136).
  - Actualmente se encuentran en investigación otras sustancias de efecto secretagogo: Diquafosol (137), Rebamipide (138), Elodoisina (139) y el ácido 15-S hidroxieicosatetraenoico (en proceso de patente).
- Oclusión lagrimal transitoria: tapones lagrimales.

Proporcionan una oclusión transitoria del sistema de drenaje lagrimal. Se insertan fácilmente y son efectivos (107,140,141). Normalmente se emplean en casos de ojo seco hiposecretor como tratamiento temporal o bien para valorar la tolerancia del paciente a la oclusión puntal definitiva y el grado de epífora.

Pueden insertarse en la porción vertical del canalículo o bien

intracanaliculares. Según su composición pueden ser reabsorbibles (tapones de colágeno, gelatina, compuestos de polímeros acrílicos termodinámicos o bien de hidroxipropilcelulosa) o no reabsorbibles (silicona, cianocrilato). Pueden ocluirse ambos canalículos en casos graves, o solamente los inferiores, lo que suele constituir la actitud inicial.

Un estudio reciente, prospectivo, encontró que la oclusión intracanalicular con el material termosensible mejoraba tanto el test de Schirmer como el BUT (140). Otros autores realizaron una revisión de estudios previos y encontraron que entre los efectos de la oclusión de la vía lagrimal se encuentran (141): la disminución de la osmolaridad lagrimal, el aumento de las células caliciformes y la disminución de los síntomas y signos del ojo seco (test de Schirmer, tinción con fluoresceína, queratitis filamentosa, ulceraciones corneales).

### 2.6.3. Ojo seco grado 3

- Suero autólogo. Ver apartado 2.7.1: “Suero autólogo”.
- Oclusión permanente de los puntos lagrimales.

Mediante cauterización de los mismos o bien cubriéndolos con un parche de conjuntiva. Pueden producir epífora molesta para el paciente.

- LDC terapéuticas.

Aunque el uso de LDC puede aumentar la evaporación de la película lagrimal y reducir el flujo lagrimal, el reservorio atrapado detrás de la lente puede contrarrestar este efecto (6). En ocasiones, se emplean las lentes esclerales permeables al gas como medida tectónica en ojos secos severos con exposición para evitar la formación de defectos epiteliales o bien para acelerar la curación de éstos.

### 2.6.4. Grado 4

- Medidas tectónicas.

Escudos y gafas protectoras. Crean un ambiente húmedo y cerrado en el que disminuye la evaporación lagrimal.

- Cirugía.

Desde la inyección de toxina botulínica y las tarsorrafias para producir

ptosis hasta procedimientos más agresivos para intentar aumentar la producción lagrimal como la transposición del conducto parotídeo, el trasplante de glándulas salivales o el implante de bombas subcutáneas de perfusión lagrimal.

- Tratamiento sistémico.
  - Fármacos inmunosupresores/inmunomoduladores. Su uso se basa en las manifestaciones extraganglionares mediadas por inmunocomplejos que acontecen en el síndrome de Sjögren (133). Pueden emplearse los corticoides y la ciclosporina orales, que no se han mostrado eficaces en los últimos estudios (142,143,144). Se está investigando el uso de otros fármacos de efecto inmunodepresor como la hidroxicloroquina (145), el rituximab (146,147), los llamados fármacos antifactor de necrosis tumoral alfa: infliximab (148) y etanercept (149); la D-penicilamina (150), el ácido micofenólico (151) y el interferón  $\alpha 2$  (152), con resultados desiguales.
  - Existen otras moléculas cuyo empleo se postula para el tratamiento del SOS (34), como la bromhexina, las hormonas sexuales o los inhibidores de la transcriptasa inversa pero todavía existen múltiples lagunas en este campo que será preciso aclarar antes de la introducción de estos compuestos en la práctica clínica.

A pesar de las múltiples opciones terapéuticas anteriormente descritas, el tratamiento del ojo seco moderado-severo sigue siendo insatisfactorio, ya que se trata de una patología crónica sin tratamiento etiológico específico. A pesar de emplear los métodos arriba expuestos, algunos pacientes siguen presentando signos y síntomas de ojo seco. El uso de sustancias que aportasen no sólo hidratación, sino nutrición y factores de crecimiento constituye una alternativa esperanzadora.

## 2.7. Antecedentes y estado actual del tema de estudio

### 2.7.1. Suero autólogo

La lágrima es de capital importancia para la lubricación y la correcta función visual, así como para asegurar la nutrición de la superficie ocular y protegerla ante agresiones.

El SOS puede producirse como consecuencia de una escasa secreción de lágrima (OSAD), una evaporación excesiva (OSE) o de deficiencias en la captación de lágrima (factores tantálicos). Independientemente del mecanismo etiopatogénico del SOS se produce una inflamación crónica de la superficie ocular (83-89), que deriva en molestias que pueden llegar a ser incapacitantes y signos que van desde la queratitis y la DGM hasta la queratinización conjuntival (24).

Los tratamientos tradicionales basados en la humectación (lágrimas artificiales y ungüentos), la preservación de la lágrima (tapones lagrimales, LDC) e incluso la inmunosupresión (corticoides, ciclosporina A) pueden paliar la sequedad y disminuir la inflamación, pero no contienen moléculas necesarias para mejorar la homeostasis de la superficie ocular alterada.

La utilización del suero autólogo (SA) en oftalmología se debe a la necesidad de encontrar sustitutos lagrimales que, además de humidificar, aporten estos componentes (factores de crecimiento, vitaminas, inmunoglobulinas) presentes en la lágrima y que se encuentran en menor concentración de la fisiológica en casos de sequedad ocular (153).

Los efectos terapéuticos de la aplicación de SA a pacientes se conoce desde el año 1984 gracias a los trabajos de Fox (4), pero su uso no se extendió hacia finales de los años 90, gracias a los trabajos de Tsubota (5).

Propiedades biológicas del SA:

- a) Acción óptica y lubricante por presentar pH y osmolaridad similares la lágrima.
- b) Contenido en factores de crecimiento en mayor concentración que la lágrima, entre los que destacan (153):
  - El Factor de Crecimiento Epitelial (EGF).
    - Acelera el proceso de reparación y cicatrización de heridas debido a que:
      - Favorece la proliferación, migración y diferenciación de las



células epiteliales y fibroblastos.

- Aumenta la síntesis de proteínas como la fibronectina y la formación de matriz extracelular.
  - Tiene efectos antiapoptóticos.
  - Aumenta la producción de mucina 1.
- El Factor  $\beta$  Transformante del Crecimiento de Fibroblastos (TGF- $\beta$ ).
    - Efecto regulador sobre otros factores de crecimiento.
    - Los efectos del TGF- $\beta$  en los procesos de regeneración corneal se consideran en general negativos, ya que por su efecto pleiotrópico, por un lado inhibe las células epiteliales y por otro presenta acción profibrótica. En acción sinérgica con PDGF y las integrinas, el TGF- $\beta$  favorece la contracción de las heridas (154,155), lo que podría dar lugar a una regeneración anómala del estroma, con la consiguiente pérdida de transparencia corneal. Por este motivo es conveniente diluir el SA para su aplicación oftalmológica (156).
    - Detalle de las acciones regenerativas del TGF- $\beta$ :
      - Inhibe la proliferación celular y la migración de queratocitos pero favorece la migración de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos.
      - Implicado en los procesos de reparación epitelial y estromal: favorece la formación de matriz extracelular, la neovascularización e inhibe las metaloproteinasas.
      - Efecto quimiotáctico sobre linfocitos.
      - Efecto antiinflamatorio.
  - El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF).
    - Su principal reservorio son los gránulos alfa de las plaquetas.
    - Regula la expresión de otros factores de crecimiento, como el TGF- $\beta$ .
    - Regula las relaciones entre células epiteliales y estroma durante los procesos de cicatrización.
    - Favorece migración y diferenciación de fibroblastos acelerando el depósito de matriz extracelular y aumentando la producción, resistencia y contracción del colágeno (155).
    - Efecto antiangiogénico y quimiotáctico sobre monocitos y

macrófagos.

- Factor de crecimiento de Fibroblastos (FGF).
    - Favorece la proliferación de la mayoría de las células implicadas en la reparación tisular.
    - Efecto quimiotáctico sobre fibroblastos.
    - Favorece las síntesis y contracción de la matriz extracelular.
    - Favorece la migración de los queratocitos.
  - Factor de Crecimiento Tipo Insulina 1 (IGF-1).
    - Regula la acción de otros factores de crecimiento.
    - Estimula la proliferación y migración del epitelio corneal.
    - Aumenta la expresión de integrinas.
    - Efecto antiapoptótico.
    - Efecto quimiotáctico para fibroblastos.
  - Factor de Crecimiento Neuronal (NGF).
    - Favorece la regeneración y crecimiento neuronal.
    - Estimula la proliferación y diferenciación de las células del epitelio corneal.
    - Favorece el crecimiento de los fibroblastos.
    - Induce neovascularización corneal.
- a) Otras moléculas reguladoras de la estabilidad y viabilidad de los epitelios de la superficie ocular (153).
- Vitamina A:
    - Mantenimiento y reparación de epitelios, mucosas, uñas, pelo y dientes
    - Propiedades antibacterianas, fortalece el sistema inmunitario estimulando la respuesta celular y humoral.
    - Efecto antioxidante mediante neutralización de radicales libres.
    - Necesaria para el proceso fisiológico de la visión. De hecho, su nombre “retinol” deriva de los pigmentos que aporta a las células retinianas. Su carencia provoca xeroftalmía (mancha de Bitot), ceguera nocturna e incluso amaurosis.

- Es uno de los principales factores epiteliotróficos presentes en el SA, siendo su concentración casi 100 veces superior a la encontrada en la lágrima (157).
- Previene los procesos de metaplasia escamosa epitelial.
- Albúmina.
  - Actividad antiapoptótica.
  - Disminuye la degradación de las citocinas y los factores de crecimiento en las zonas de lesión tisular (5,158).
- $\alpha$ 2-macroglobulina.
 

Actividad anticolagenasa.
- Fibronectina.
  - Es uno de los factores de mayor importancia en la migración celular en los procesos de reparación.
  - Su concentración en suero es casi 10 veces superior al plasma (157). Como ocurre con otras sustancias tróficas, su concentración plasmática se halla disminuida en pacientes con enfermedades autoinmunes o con tratamiento inmunosupresor (153).
  - El colirio de fibrina ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de defectos epiteliales persistentes.
- Sustancia P.
 

Implicada en la migración del epitelio corneal y los queratocitos actuando sinérgicamente con el IGF-1 (160).
- IgG, lisozima, lactoferrina y factores del complemento.
- Aportan efecto antimicrobiano.

Todos estos nutrientes promueven el trofismo celular del epitelio corneal interviniendo en su regeneración mediante la proliferación, migración y diferenciación de las células epiteliales (154).

Geerling (157) comparó las concentraciones de algunas de las moléculas moléculas anteriormente mencionadas en la lágrima y el SA, encontrando concentraciones superiores en el EFG, el TGF, la vitamina A, la lisozima y la fibronectina, entre otros (ver tabla 4).

	<b>Lágrima</b>	<b>Suero Autólogo</b>
<b>EGF (ng/ml)</b>	0,2-3,0	0,5
<b>TGF-<math>\alpha</math> (ng/ml)</b>	2-10	6-33
<b>Vitamina A (mg/ml)</b>	0,02	46
<b>Lisozima (mg/ml)</b>	1,4	6
<b>Fibronectina (mg/ml)</b>	21	205

*Tabla 4. Componentes en la lágrima y en el suero autólogo (161)*

### 2.7.1.A. Efectos biológicos (161)

#### a) Efectos sobre la viabilidad celular.

Noble (23) afirma que la aplicación de SA es superior al empleo de lágrimas artificiales. Poon (162) demostró que el SA aumenta los índices de viabilidad celular en mayor medida que terapia sustitutiva con hidroxipropilmetilcelulosa.

#### b) Efectos sobre el epitelio.

Es una de las funciones más destacadas del SA y se debe a la gran cantidad de factores de crecimiento y factores tróficos, cuyos efectos se han detallado en el epígrafe anterior (“2.7.1.A. Introducción y propiedades”), y que contribuyen a la homeostasis de los epitelios de la superficie ocular. Dichos factores suelen hallarse disminuidos en los pacientes afectados de SOS (161).

#### c) Efectos sobre la mucina.

Las más importantes a nivel de la superficie ocular son la MUC1, MUC2, MUC4, MUC5 y MUC7 (161). Diversas enfermedades de la superficie ocular cursan con una disfunción en la expresión de mucinas: la MUC5 en el síndrome de Sjögren (163) y las MUC1, MUC2, MUC4, MUC5 en el SOS (161).

El SA presenta una acción positiva dosis-dependiente, provocando el aumento de la expresión del receptor MUC1. Asimismo, la actividad de células caliciformes está muy relacionada con la presencia de la vitamina A, presente en el SA en mayor concentración que en la lágrima (5,158,161).

d) Efectos sobre la metaplasia escamosa.

La metaplasia escamosa es un proceso reversible que ocurre en los epitelios no queratinizados cuando ante una agresión reaccionan queratinizándose. El tratamiento con SA mejora de forma significativa el grado de metaplasia escamosa de los epitelios corneal y conjuntival (5,23,158). La vitamina A parece ser el componente del SA más relacionado con la mejoría en el grado de metaplasia escamosa (18,158).

e) Efectos sobre la estabilidad de la película lagrimal.

- Efectos sobre el test de Schirmer. En general el tratamiento con SA tiene pocos efectos sobre el test de Schirmer (5,23,158).
- Efectos sobre el BUT. Kojima (164) encuentra mejoría en el BUT de pacientes tratados con SA al compararlos con el uso de humectantes comerciales. La mejoría del BUT se debe al efecto del suero sobre el epitelio y las mucinas (161).
- Efectos sobre la tinción con fluoresceína. Se ha descrito una disminución en el área teñida tras el uso de SA (162,165).

f) Efectos sobre la sensibilidad corneal.

El SA contiene factores neurotróficos que contribuyen a la regenerar los nervios corneales. Matsumoto encontró que la sensibilidad corneal mejora tras el uso de SA (16).

g) Efectos sobre la neovascularización y transparencia corneal.

El SA presenta un efecto indirecto sobre la neovascularización al potenciar la función limbar mediante los factores de crecimiento, mejorar la función de barrera de las células epiteliales y disminuir la inflamación derivada de los defectos epiteliales (161).

h) Efectos bactericidas.

- El SA, al mantener el óptimas condiciones la superficie ocular, permite indirectamente que actúen sus mecanismo defensivos:

- La función mecánica de dilución y barrido de los gérmenes de la película lagrimal.
- La capa de mucina disminuye la probabilidad de que los microorganismos se adhieran al epitelio corneal.
- El mantenimiento de la integridad epitelial es asimismo fundamental para evitar la invasión de microorganismos patógenos: sólo *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Haemophilus ssp* son capaces de penetrar en el epitelio corneal intacto.
- Por otro lado, los componentes del SA ejercen directamente su función antimicrobiana: lisozima contra los Gram+, la lactoferrina interfiriendo en la captación de  $\text{Fe}^{++}$  por parte de los micoroorganismos y por último las inmuglobulinas y los factores del complemento que forman parte de la inmunidad humoral.

Asimismo es importante señalar que el SA no contiene conservantes que puedan dañar la superficie ocular.

#### 2.7.1.B. Efectos sobre el ojo seco

El SOS fue la primera utilización del SA en oftalmología (4). Casi todos los autores observan una mejoría subjetiva considerable sólo después de 48 horas de iniciado el tratamiento (23,165,166): Tsubota (158) y Poon (162) hallan mejoría en los síntomas, la tinción con fluoresceína y el test de Schirmer, que desaparecen tras cuatro semanas de suspender la aplicación. Parece que también existe un efecto dosis-dependiente (165).

El SOS secundario al síndrome de Sjögren es uno de los más graves y resistentes al tratamiento ya que tanto la producción basal como refleja de lágrima se encuentran muy disminuidas (167, 168). Tsubota (158) señala que el SA por presentar características bioquímicas y biomecánicas similares a la lágrima, ser hipoalergénico y aportar factores tróficos a la superficie ocular, es el tratamiento de elección en estos pacientes. Por su parte, Noble (23) y Kojima (157) en sus estudios randomizados y prospectivos empleando SA en pacientes con síndrome de Sjögren,

sólo encuentran mejoría en la sintomatología y en la citología de impresión conjuntival.

Hyon (168) asoció terapia inmunomoduladora (corticoides y ciclosporina A) al tratamiento con SA en pacientes con síndrome de Sjögren y observó mejoría en la agudeza visual y la tinción con fluoresceína, pero, en consonancia con otros estudios, el test de Schirmer y el BUT no mostraron variaciones. Balado Vázquez (167) sugiere que la asociación de inmunomoduladores puede ser beneficiosa en estos pacientes de cara a aumentar la secreción lagrimal.

#### 2.7.1.C. Otras aplicaciones

En los últimos años, el empleo del SA se ha ido extendiendo debido al aumento de patologías susceptibles de su indicación, así como la disponibilidad de bancos de tejidos dotados de la infraestructura necesaria para su preparación dentro de un sistema de calidad implantado.

En principio, el SA tópico está indicado en tres grandes contextos, que muchas veces se solapan (164):

- Cuando exista déficit de nutrientes a nivel lagrimal, siendo la situación más frecuente el SOS.
- Cuando se intenta mejorar el crecimiento y/o mantenimiento de los epitelios corneales.
- Cuando exista un sustrato inflamatorio o neurotrófico subyacente

El colirio de SA constituye hoy día una alternativa terapéutica eficaz para el tratamiento de las enfermedades de la superficie ocular no respondedoras a tratamiento convencional (9,10,11), empleándose con éxito en numerosas patologías además del ojo seco: defectos epiteliales persistentes (12), erosiones recurrentes (13,14,15), úlceras neurotróficas (16), Enfermedad Injerto contra Huésped (17), queratopatía anirídica (18), queratoconjuntivitis límbica superior (19), cirugía vítreo-retiniana de agujeros maculares (20, 21, 22), etc.

#### 2.7.1.D. Tolerancia y efecto secundarios

El SA es un tratamiento que presenta un buen perfil de seguridad y tolerancia, sin efectos secundarios relevantes descritos, incluso en tratamientos de

larga duración (5). Sin embargo, por no poseer conservantes, existe el riesgo de contaminación (169). Se han descrito un número escaso de contaminaciones (7,158,162).

Teóricamente, los anticuerpos y antígenos presentes en el suero pueden ocasionar reacciones inmunológicas (169). Se ha descrito la formación de un infiltrado anular en un paciente tratado por defecto epitelial persistente post-queratitis herpética (170) y de un infiltrado periférico en un caso de ojo seco asociado a artritis reumatoide (157).

#### 2.7.1.E. Preparación

La elaboración del SA no es especialmente compleja y no supone un alto coste sanitario. Se lleva a cabo bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar (grado A) y en entorno D de tratamiento de aire; bajo previa indicación facultativa y tras descartar patología infecciosa mediante control serológico.

Habitualmente se prepara al 20% salvo excepciones justificadas. Los viales se almacenan en nevera a 4°C, siendo su caducidad de 21 días. Se entregan al paciente los viales protegidos con papel de aluminio y se adjuntan las normas de empleo. El procedimiento de preparación puede variar según el centro de procesamiento, siendo variables en el proceso la concentración de la preparación, la utilización de filtros, el tiempo de almacenamiento en fresco así como el medio para realizar la concentración exigida.

Actualmente, no existe consenso sobre la concentración a la que preparar el SA para la administración en colirio ocular, ya que hay grupos que lo están administrando al 10, 20, 40, 50, 80 y hasta 100% en una solución normalmente fisiológica. La concentración al 20% parece suficiente y evita las molestias derivadas de la mayor viscosidad de preparados más concentrados y disminuye considerablemente el número de extracciones de sangre (157).

#### 2.7.1.F. Legislación vigente

La legislación que le compete al colirio de SA no es uniforme a nivel mundial, así pues, en EE.UU. está regulado por la *Food and Drug Administration* (FDA) al considerarlo como un producto farmacéutico. En Inglaterra y País de



Gales el protocolo estandarizado de preparación sigue las directrices del Servicio Nacional de la Sangre y la Agencia de Control de Medicamentos de Gran Bretaña y de acuerdo con la guía de autotransfusión del *British Comitee for Standard in Haematology* (171). En Alemania, el protocolo estándar de preparación sigue las directrices de la guía del *Bundesärztekammer* y del Instituto Paul Ehrlich para donación y uso de productos hemáticos. En estos protocolos se aplican los mismos criterios que para la extracción de sangre destinada a donación, es decir, a los pacientes se les realiza un despistaje de enfermedades infecciosas de transmisión parenteral.

En España, el colirio de SA no tiene una legislación específica que lo contemple, si bien se establecen algunas referencias legales que amparan esta terapia clínica. Son cuatro los reales decretos que los autores manejan como referentes a esta modalidad terapéutica:

*1- Real Decreto 175/2001 de 23 de febrero, por el que se aprueban las normas de correcta elaboración y control de calidad de fórmulas magistrales y preparados oficinales.*

*2- Real Decreto 1015/2009, de 19 de junio, por el que se regula la disponibilidad de medicamentos en situaciones especiales.*

*3- Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión.*

*4- Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos.*

Entre los inconvenientes de la aplicación del SA se encuentran la frecuencia en el número de extracciones de sangre, sobre todo en aquellos pacientes con tratamiento anticoagulante o antiagregante, que pueden desarrollar hematomas post extracción; y el peligro que supone el hecho que el paciente padezca una enfermedad infecciosa, con la posibilidad de contagio.

## 2.7.2. Suero heterólogo de sangre periférica

### 2.7.2.A. Propiedades

Las características del suero heterólogo (SH) no difieren de las del SA. Puede ser beneficioso su uso en algunos pacientes que presenten ciertas limitaciones en la extracción de su propio suero para realizar el colirio. Entre éstas podrían encontrarse la edad y limitaciones del paciente, la falta de medios para desplazarse periódicamente a realizarlo, el padecimiento de enfermedades autoinmunes que puedan poner en tela de juicio la calidad y eficacia del suero y enfermedades infecciosas transmisibles, sobre todo infección activa por VHC y VIH. También sería interesante emplearlo en caso de niños no colaboradores.

### 2.7.2.B. Preparación

Igual al proceso descrito para el SA, pero con sangre procedente del Banco de donantes de sangre.

### 2.7.2.C. Comparación con suero autólogo

Hay algunos pacientes en los que no es recomendable la aplicación del SA. Esta evidencia fue contemplada en el Centro Regional de Transfusión Sanguínea (CRTS). Por ello, y en consenso con el servicio de Oftalmología, desde el comienzo del programa de empleo de SA, se ha aplicado SH procedente de donante de sangre a pacientes con dichas características. Se seleccionan donantes de sangre habituales del grupo AB para evitar problemas de rechazo antigénico, firmando un consentimiento informado sobre los fines de esa donación. Recientemente se ha realizado un estudio en el que se plantea la necesidad de valorar ambos grupos de pacientes mediante un cuestionario de autoevaluación realizado a los pacientes antes y después de la utilización del colirio (26).

## 2.7.3. Suero de sangre de cordón umbilical

### 2.7.3.A. Propiedades

Yoon investigó la eficacia del suero de sangre de cordón umbilical (SCU) en pacientes con SOS severo de diversa etiología (28) y SOS grave asociado a EICH (29), así como pacientes con defecto epitelial persistente (27) y con queratitis neurotrófica (172), quemaduras oculares (173,174) y problemas de la superficie ocular tras cirugía refractiva (173, 174).

En el SOS el uso de colirio de SCU mejoró el BUT, la tinción epitelial, el grado de metaplasia escamosa, la densidad de células caliciformes y las puntuaciones en los cuestionarios (28). Otros autores han hallado asimismo mejoras en el daño epitelial, la puntuación en los cuestionarios, la citología de impresión conjuntival, la osmolaridad lagrimal y la sensibilidad corneal (175).

### 2.7.3.B. Comparación entre suero de sangre de cordón umbilical y suero autólogo

Yoon también comparó los niveles de componentes esenciales de la lágrima en el SCU y en el SA (173,174). Ambos sueros mostraron mejoría en los síntomas, el BUT, la tinción corneal y la citología de impresión conjuntival (en SA, sólo en los pacientes sin síndrome de Sjögren). Sin embargo, el tratamiento con SCU obtenía mejores resultados en la sintomatología, la tinción corneal y la citología de impresión conjuntival en pacientes con síndrome de Sjögren. Asimismo, halló que el SCU contenía tres veces más EGF y dos veces más TGF $\beta$ . También eran superiores las concentraciones, pero en menor medida, del NGF y la sustancia P. El SA contenía, en cambio, IFG-1 en mayor proporción. La presencia de vitamina A en el SCU, aunque menor que en el SA, era superior a la presente en la lágrima endógena y suficiente para prevenir metaplasia escamosa.

Según Yoon, la terapia con SCU tiene ventajas en los efectos clínicos sobre la terapia con SA y presenta el mismo nivel de seguridad, siempre que se realice a las madres donantes una serología previa. Por tanto, emplear el SCU presenta tres ventajas adicionales (173, 174, 176):

1. La obtención de SCU de donante genera suero para muchos pacientes.
2. Este suero puede conservarse, de manera que el tiempo de espera para administrarlo al paciente es mínimo.
3. Este suero puede emplearse, en los mismos casos que el SH de sangre

periférica, para pacientes en que no sea recomendable/plausible la extracción sanguínea periódica.

### 2.7.3.C. Comparación entre suero de sangre de cordón umbilical y suero heterólogo

La principal ventaja del SCU comparado con el SH es que no es necesario emplear sangre de banco, que es escasa y puede destinarse a otros múltiples fines, sino que una vez descartada la donación de sangre de cordón umbilical para realizar un trasplante de progenitores hematopoyéticos, puede emplearse únicamente para realizar colirio de SCU.

Por otro lado, la sangre de cordón umbilical no posee aglutininas, y por lo tanto no es antigénico. La sangre de banco empleada para realizar SH tiene provenir necesariamente de donantes AB.

### 2.7.3.D. Preparación del colirio de suero de sangre de cordón umbilical

La sangre del cordón umbilical se extrae de las gestantes durante el parto. Se realizan test serológicos previos en las semanas 8 y 38 de gestación para descartar VHB, VHC y VIH. Tras el parto, se obtiene una muestra de 60 a 80 mL de sangre de la vena del cordón umbilical (figura 6).



*Figura 6. Extracción de muestra de sangre de la vena del cordón umbilical*

La muestra se mantiene dos horas a temperatura ambiente y se dispensa en tubos de cristal estériles de 10 mL. Después de 20 minutos de centrifugación a 2800G a 20°C, se decanta el sobrenadante y se diluye al 20% con solución salina balanceada (BSS) (figura 7).



*Figura 7. Preparación del colirio de SCU con BSS.*

Los viales de colirio resultantes son etiquetados, se introducen en congelador eléctrico a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se almacenan en condiciones estériles, en nuestro caso y protegidos con un papel de aluminio para evitar la degradación de vitamina A por la luz (figura 8). Una vez abiertos, los recipientes se conservan a  $4^{\circ}\text{C}$  en la nevera durante un máximo de una semana. Los recipientes sin abrir pueden conservarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  de tres a seis meses (173).



*Figura 8. Colirio de SCU etiquetado y protegido con papel de aluminio.*

Para la elaboración de los viales de nuestro estudio se han tenido en cuenta los siguientes criterios de selección:

- Unidades con menos de 24 horas desde la extracción a la separación.
- Historia y antecedentes obstétricos normales, de unidades no aptas para el procesamiento al banco público.
- Consentimiento informado específico.

Como controles de calidad se realiza un hemocultivo inicial y final del proceso y conteo celular del sobrenadante con ausencia de células. Se reservaron alícuotas para la determinación de factores de crecimiento.

#### 2.7.4. Derivados hemáticos plaquetarios

Las plaquetas tienen un papel fundamental en la regeneración tisular y constituyen un reservorio de factores de crecimiento, factores fibrinolíticos, proteínas de adhesión y quimiocinas.

Los derivados hemáticos plaquetarios se obtienen mediante la centrifugación de la sangre, obteniéndose el plasma con una gran concentración de plaquetas. Al aplicar el plasma en la superficie ocular, se produce un coágulo de fibrina que va liberando los factores de crecimiento contenidos en las plaquetas lentamente.

Los derivados plaquetarios que se emplean con mayor frecuencia en oftalmología son el colirio de plasma enriquecido en plaquetas y el colirio plasma rico en factores de crecimiento. Ambos se diferencian básicamente en su modo de preparación, que a su vez presenta muchas variantes (177). Por ello, las evidencias clínicas sobre su uso son inconstantes. Sin embargo, algunos autores han obtenido buenos resultados aplicando los concentrados autólogos de plaquetas para el SOS, úlceras neurotróficas y síndrome de post-intervención con LASIK (178, 179).

# Material y métodos

# 3. Material y métodos

## 3. 1. Universo y muestra

### 3.1.1. Ámbito de estudio

Los pacientes han sido reclutados entre los que acudieron al Hospital Regional Universitario Carlos Haya de Málaga, tanto al Servicio de Oftalmología como al resto de servicios del Complejo Hospitalario, durante el periodo de septiembre del 2011 a mayo de 2015.

### 3.1.2. Criterios de inclusión

Es necesario cumplir dos o más criterios de los tres siguientes:

- a) Síntomas de ojo seco por más de tres meses.
- b) Test de Schirmer tipo I  $\leq 5$  mm.
- c) Tiempo de ruptura lagrimal  $\leq$  a 5 segundos.

Se incluyen en el estudio los pacientes con SOS de las siguientes etiologías:

- a) SOS no asociado a colagenopatía
  - Idiopático.
  - Secundario: Disfunción de las glándulas de Meibomio (mediante observación del reborde palpebral y la expresión de las glándulas) y demás causas de OSE, SOS mucodeficiente, síndrome del párpado flácido, queratoconjuntivitis límbica superior, SOS secundario a radioterapia, queratopatía bullosa, enfermedad de Graves-Basedow,...
- b) SOS secundario a síndrome de Sjögren, primario o secundario:
  - Artritis reumatoide.
  - Lupus eritematoso sistémico.
  - Esclerodermia.
  - Dermatomiositis.
  - Enfermedad mixta del tejido conectivo.



- Tiroiditis de Hashimoto.
  - Cirrosis biliar primaria.
  - Hepatitis crónica autoinmune.
- c) Causas oftalmológicas
- Úlcera neurotrófica.
  - Defecto epitelial persistente.
  - Queratopatía por exposición.
  - Queratopatía cálcica.
  - Distrofias corneales.
  - Úlceras marginales secundarias a vasculitis sistémicas.
  - Úlcera de Mooren.
  - Úlcera de Terrien.
  - EICH.
  - Síndrome de insuficiencia limbar.
  - Síndrome de Stevens-Johnson.
  - Penfigoide.
  - Causticación corneal.

### 3.1.3 Criterios de exclusión

- a) Menores de 18 años.
- b) Mujeres embarazadas o que puedan estarlo.
- c) Usuarios de lentes de contacto.
- d) Historia de alergia ocular en los últimos tres meses.
- e) Cirugía intraocular o refractiva en los últimos seis meses.
- f) Alteraciones anatómicas de párpado y pestañas.
- g) Enfermedades infecto-contagiosas (VIH, VHC, VHB).

## 3.2. Metodología

Los datos del presente trabajo se extrajeron de un ensayo clínico aleatorizado, unicéntrico, de tres ramas paralelas (SA, SH, SCU) para el tratamiento del ojo moderado-severo, con número muestral de 123 pacientes. En cada grupo se

evaluaron criterios subjetivos y objetivos de mejoría en el momento de inicio del tratamiento, al mes de la inclusión y tras un seguimiento de 3 meses.

### 3.2.1. Justificación del tamaño muestral

Para determinar el tamaño mínimo de la muestra se emplearon métodos estadísticos avanzados debido a la complejidad del estudio, al considerar tres grupos de tratamiento para ser comparados entre sí. Se ha tenido como punto de partida (muestra piloto) las medias y desviaciones típicas ponderadas del estudio de Yoon (174) en que comparaba SA con SCU en el tratamiento del ojo seco.

Se ha tomado como unidad de medida el milímetro (mm). Para el test de Schirmer se ha considerado una media de  $\mu = 3.63$  mm y una desviación típica ponderada de  $\sigma = 1.45$  mm (correspondientes al trabajo antes aludido). Si tomamos como error de estimación de la medida un 25%, se obtiene en la expresión (1) un  $\delta = 0.90$  (siendo 0.9 el 25% de 3.63). Es un valor moderadamente alto ya que el coeficiente de variación (CV) en nuestro caso es:

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} = \frac{1.45}{3.63} = 0.399 (\approx 39.9\%)$$

Para aplicar el análisis, consideramos una significación  $\alpha = 0,05$  (es decir, un intervalo de confianza  $1 - \alpha = 0,95$ );  $k = 3$  (es decir 3 muestras) y una cuasivarianza  $S^2 \cong 1,45^2 = 2,1$ , el tamaño de la muestra ( $n$ ) de cada uno de los grupos y la mínima diferencia  $\delta = 0,9$  entre las medias, que puede detectarse con una potencia de  $1 - \beta$ , están relacionadas por la igualdad (180):

$$(1) \varphi = \sqrt{\frac{n \delta^2}{2 k S^2}} = \sqrt{\frac{n \cdot 0.9^2}{2 \cdot 3 \cdot 1.45^2}}$$

La potencia  $1 - \beta$  y  $\varphi$  se relacionan mediante una familia de curvas que aparecen en las tablas del anexo 5 del citado texto (183) que depende de los grados de libertad  $v_1 = k - 1 = 2$  y de  $v_2 = k (n-1)$ . Hay que tener en cuenta que la potencia que se utilice debe cumplir  $v_2 > 81$  ( $n-1 > \frac{81}{3} \Rightarrow n - 1 > 27$ ):

Con una potencia para el test de 0,7,  $\varphi \cong 1,6 \Rightarrow \varphi = \sqrt{\frac{n \cdot 0.9^2}{2 \cdot 3 \cdot 1.45^2}} \Rightarrow$

41 (N total = 3 x 41 = 123).

### 3.2.2. Recogida de datos

Se seleccionaron los pacientes con SOS que cumpliesen dos de los tres criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión anteriormente mencionados, durante el periodo de septiembre de 2011 a mayo de 2015.

En primer lugar, se le explicó al sujeto de estudio las características del ensayo y los posibles riesgos. En caso de que el paciente estuviera de acuerdo, firmó dos copias del Consentimiento Informado (ver documento anexo) y se procedió a elaborar la historia clínica del paciente y a realizar una exploración oftalmológica exhaustiva, valorando el grado de ojo seco y alteración de la superficie ocular, así como otras patologías oftalmológicas concomitantes.

Siguiendo las recomendaciones del Subcomité para el Diseño de Ensayos Clínicos del Taller Internacional de Ojo Seco (24), incluimos en nuestro ensayo clínico los siguientes parámetros de valoración:

1. Determinación del volumen y la producción lagrimal mediante la prueba de Schirmer tipo I sin anestesia, mediante las tiras Alcon Tear Test Schirmer 35x5mm Strip 250/Bx, Laboratorios Alcon, Forth Worth, Texas.
2. Determinación del estado del epitelio córneo-conjuntival mediante las tiras de verde de lisamina Dina Strip Lissaver-Plus V, laboratorios Gecis, Villemorant, Neung-sur-Beuvron, Francia.
3. Determinación de la estabilidad lagrimal mediante test de la ruptura lagrimal con fluoresceína (BUT), mediante el colirio Colircusí Fluotest 3m, solución oftálmica, Laboratorios Alcon, Forth Worth, Texas.
4. Determinación de la integridad de la superficie ocular mediante la realización de la tinción con fluoresceína, mediante el colirio Colircusí Fluotest 3m, solución oftálmica, Laboratorios Alcon, Forth Worth, Texas.
5. Evaluación de los síntomas subjetivos del paciente mediante cuestionario validado para ojo seco (104).

Aquellos ojos de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y no presentaban ningún criterio de exclusión fueron incluidos en el ensayo clínico. El oftalmólogo, a continuación, instruyó al paciente en la técnica de la instilación de colirio y se insistió sobre la importancia del cumplimiento terapéutico.

Posteriormente, el paciente era derivado al Centro Regional de Tranfusión Sanguínea donde se realizaba la extracción sanguínea, independientemente del tipo de suero que se le fuese a administrar. La elaboración de los colirios, así como de las pruebas de despistaje para la detección de enfermedades infecto-contagiosas, corrieron a cargo del técnico de laboratorio (realización del despistaje de agentes transmisibles en los pacientes y en el SCU).

Una vez descartadas las enfermedades infecto-contagiosas, el facultativo especialista en Hematología y Hematoterapia aleatorizaba el/los ojo/s del paciente. Dicha aleatorización se realizó en estratos, mediante el correspondiente procedimiento de minimización por bloques. El hematólogo poseía especificado en hoja de cálculo *Excel* qué colirio se dispensaba a cada paciente. El paciente recibía un sobre cerrado con la numeración correspondiente al envase que se le había asignado de manera aleatoria, de manera que el enmascaramiento fuese efectivo tanto para el paciente como para el oftalmólogo. La pauta de aplicación del suero ha sido de una gota en el/los ojo/s incluidos en el ensayo clínico 5 veces al día (se recomendaba la instilación cada 3-4 hora, durante el día, con descanso nocturno).

Los pacientes eran evaluados de nuevo por el oftalmólogo, realizando las pruebas anteriormente reflejadas al mes y a los tres meses desde el momento que comenzó el tratamiento. Asimismo, los pacientes cumplimentaban de nuevo el cuestionario para ojo seco, con escalas para los síntomas en cada una de las visitas.

### 3.2.3. Determinaciones

#### 3.2.3.A. Agentes transmisibles

Para las determinaciones de agentes transmisibles se emplearon:

- Los tests para la determinación de HBsAg, anti VIH 1+2-Ag p24 y anti VHC fueron realizados en el autoanalizador PRISMA®. Abbott. Analizador de inmunología automático por quimioluminiscencia.
- El anti-core de VHB se ha realizado mediante el sistema Architect® Abbott de Inmunoensayo. Este analizador tiene un diseño modular que proporciona una estación de trabajo única en la que se pueden procesar a la vez distintos tipos de ensayos mediante un único centro de control para todo el sistema. En el CRTS de Málaga se utiliza, además, para la detección de anticuerpos totales en la enfermedad de Chagas, en la sífilis, así como para determinar anticuerpos totales, anti-HTLV ½.
- La técnica utilizada para escrutinio de sífilis fue el RPR (reagina rápida en plasma), cuyo fundamento es que las reaginas plasmáticas, anticuerpos dirigidos contra antígenos no treponémicos, producen agregación con determinados antígenos (cardiolipina, lecitina y colesterol, liberados a la sangre por daño del treponema durante la infección), reacción que se puede determinar macroscópicamente en los estudios de aglutinación.
- Los reactivos para la determinación de RPR usados forman parte del kit RPR-CARBON Aglutinación, de Biosystems® SA, que contiene partículas de carbón que facilitan la lectura de la aglutinación en microplacas de 96 pocillos, así como control positivo y negativo.
- La técnica NAT en muestra única para detección del genoma viral del VHC, VHB y del VIH es un test Ultrio® de la casa comercial Chiron-Novartis. Es un test cualitativo in vitro para detectar ácidos nucleicos de los tres virus.

#### 3.2.3.B. Grupo ABO/ RH Y AAI

- La realización de los mismos se realizó en el autoanalizador Galileo® de Inmucor con técnica de microplaca.
- Los donantes heterólogos de banco fueron seleccionados de grupo AB, pues carecen de aglutininas anti-A y Anti-B en su suero.
- Se realizó una determinación de AAI en todos los casos, para valorar una posible sensibilización en caso de uso en pacientes heterólogos.

#### 3.2.3.C. Moléculas

Se realizaron determinaciones en los sueros mediante ELISA de albúmina, fibronectina, factores de crecimiento (TGF-  $\beta$  y EGF), vitamina A, vitamina E, IgG, IgA e IgM. Todas las determinaciones se realizaron en suero guardado a -80°C.

- EGF y TGF-  $\beta$ 1:

Los valores de EGF y TGF-  $\beta$ 1 se determinaron mediante inmunoensayo de fluorescencia con citometría de flujo en un citómetro Beckman Coulter FC500, empleando el kit FlowCytomix multiplex (eBioscience) (Human TGF-  $\beta$ 1: ref. BMS8249FF y EGF: ref. BMS82070FF). El análisis de los datos se llevó a cabo usando el programa FlowCytomixPro, versión 3.0.

- Fibronectina:

Los valores de fibronectina se establecieron mediante el kit ELISA (Platinum ELISA affymetrix, eBioscience, ref. BMS2028). En todos los casos se siguieron las recomendaciones del fabricante.

- Vitamina A y Vitamina E: Se determinaron de forma simultanea, mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC, con reactivos de Bio-Rad®.
- Albúmina: Se ha determinado mediante estudio espectrofotométrico con verde de bromocresol.
- IgG, IgM e IgA: Se analizaron en un autoanalizador Vista® mediante inmunonefelometría.

### 3.2.4. Variables

#### 3.2.4.A. Variables primarias

Respuesta al tratamiento del ojo seco con los distintos sueros, mediante:

- Puntuación de test de Schirmer.
- Puntuación de la escala de van Bijsterveld para la tinción con verde de lisamina.
- Tiempo de rotura lagrimal (BUT).
- Puntuación de la escala de Oxford para la tinción con fluoresceína.
- Puntuación del cuestionario de Donate (104).

#### 3.2.4.B. Variables secundarias

- Presencia o no de enfermedad autoinmune.

- Adherencia al tratamiento.
- Concentración de las distintas moléculas en los dos sueros.

VARIABLE	TIPO	VALOR
Test de Schirmer	Cuantitativa continua	mm
BUT	Cuantitativa continua	seg
Tinción con fluoresceína (escala de Oxford)	Cuantitativa continua	0-9
Tinción con verde de lisamina (escala de van Bijsterveld)	Cuantitativa continua	0-5
Cuestionario (Donate)	Cuantitativa ordinal	0-72
Enfermedad autoinmune	Categorica dicotómica	Sí/no
Concentración moléculas (albúmina, fibronectina, vitamina A, vitamina E, IgG, IgA, IgM, TGF- $\beta$ 1, EGF)	Cuantitativa continua	Distintos valores
Adherencia al tratamiento	Categorica dicotómica	Sí/no

Tabla 5. Variables de estudio. BUT: Break-up time (tiempo de rotura lagrimal).

### 3.3. Métodos de recolección de la información

La información de los pacientes y las pruebas efectuadas se guardaron en un PC específico para el ensayo clínico con ambiente de Windows VII. Los textos se procesaron con Word, y las tablas y gráficos, mediante con Excel.

Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el programa estadístico de libre acceso R Project versión 3.1.2.

# Resultados



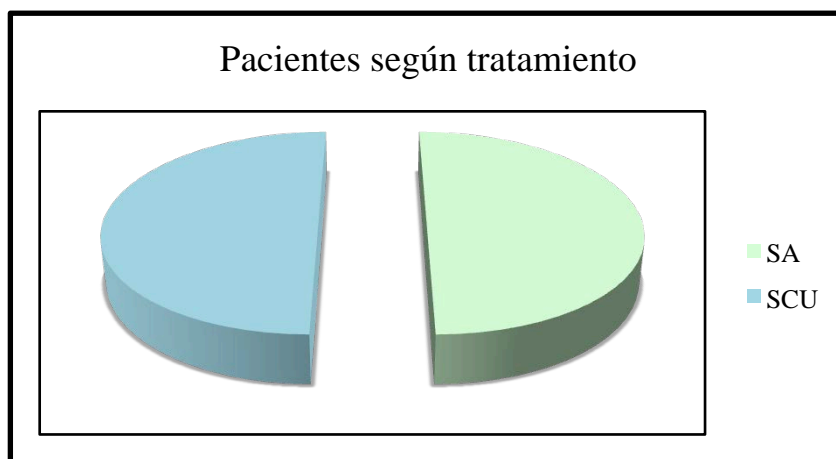
## 4. Resultados

### 4.1. Datos demográficos

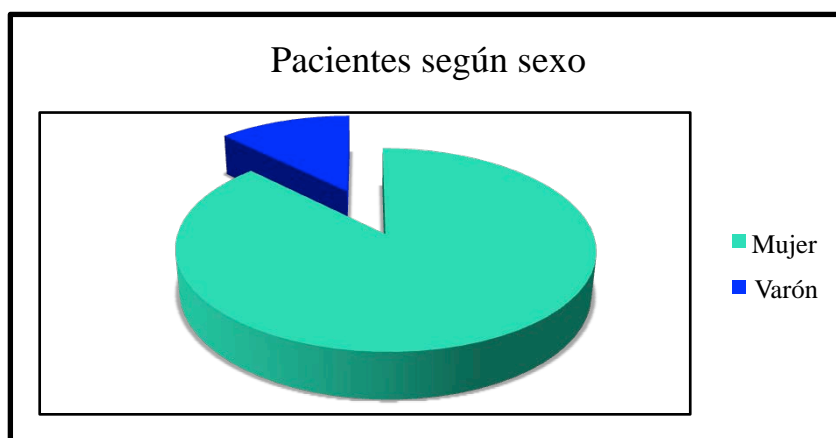
- Número de pacientes: 64 ojos, 32 SA y 32 SCU, de 32 pacientes, 16 en cada grupo (Cuadro 1).
- Sexo: 28 mujeres (86%), 4 varones (Tabla 6, cuadro 2).
- Edad media: 61,5 años, rango 44-88. La edad media era de 56 (45,9 - 64) años en el grupo tratado con SA y de 62 años (57,75 – 69,25) en el grupo tratado con SCU. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p = 0,010$ ).
- Abandonos: 14 ojos, 7 pacientes, no terminan el estudio (Cuadro 3).
- Enfermedad autoinmune previa: 43 ojos (67%, tabla 6, cuadro 4).
- Tratamiento previo con SA: 12 (38%) ojos del grupo tratado con SA y 8 ojos del grupo tratado con SCU (25%) (Tabla 6).
- Menopausia: el 85% de las 28 mujeres incluidas en el estudio (Tabla 6, cuadro 5).

Variable	Categorías	SA	%	SCU	%	Ntotal	%total
<b>Sexo</b>	Hombre	0	0,0	8	25,0	8	12,5
	Mujer	32	100,0	24	75,0	56	87,5
$p = 0,0048$	Todos	32	100,0	32	100,0	64	100,0
<b>Enf. autoinmune</b>	No	11	34,4	10	31,2	21	32,8
	Sí	21	65,6	22	68,8	43	67,2
$p = 1,00$	Todos	32	100,0	32	100,0	64	100,0
<b>Trat. previo</b>	No	20	62,5	24	75,0	44	68,8
	Sí	12	37,5	8	25,0	20	31,2
$p = 0,42$	Todos	32	100,0	32	100,0	64	100,0
<b>Menopausia</b>	No	6	20,7	2	8,3	8	15,1
	Sí	23	79,3	22	91,7	45	84,9
$p = 0,27$	Todos	29	100,0	24	100,0	53	100,0

Tabla 6. Descriptivo variables cualitativas



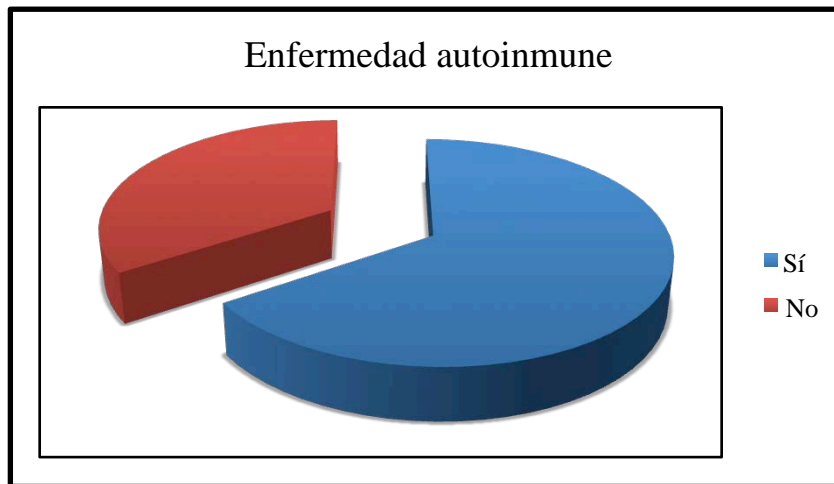
*Cuadro 1. Distribución de pacientes según tratamiento.*



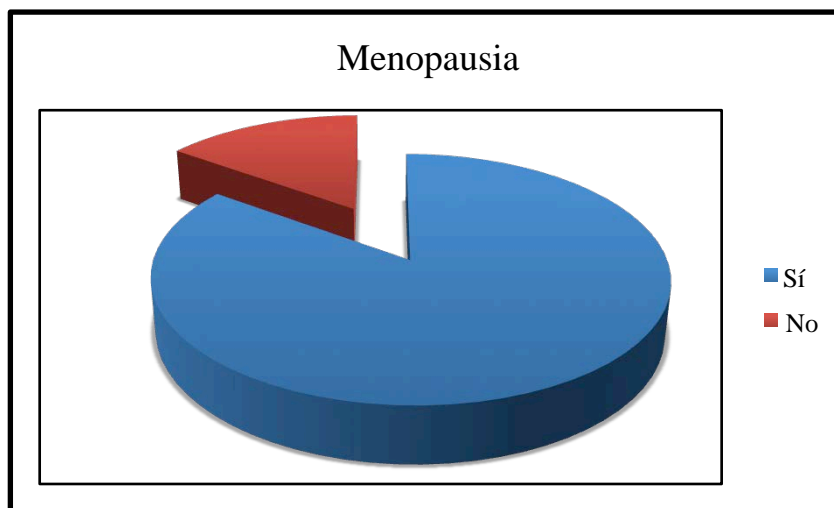
*Cuadro 2. Distribución de pacientes según sexo.*



*Cuadro 3. Distribución de pacientes según finalizan o no el ensayo.*



*Cuadro 4. Distribución de pacientes según la presencia de enfermedad autoinmune.*



*Cuadro 5. Distribución de pacientes femeninas según la presencia de menopausia.*

## 4.2. Respuesta al tratamiento con los distintos sueros

Respuesta al tratamiento del ojo seco con los distintos sueros, medida por el cambio producido por la terapia en:

- 1) Test de Schirmer (mm).
- 2) Tiempo de rotura lagrimal o BUT, en segundos.
- 3) Tinción de fluoresceína de la superficie ocular, según la escala de Oxford.
- 4) Tinción con verde lisamina del epitelio córneo-conjuntival, evaluada según la escala de van Bijsterveld.
- 5) Cuestionario de Donate (104).

#### 4.2.1. Análisis de las variables en dos grupos independientes

*No existen diferencias estadísticamente significativas en las pruebas realizadas, en ninguna de las visitas (cuadro 6).*

	<b>SA</b>	<b>SCU</b>	<b>p</b>	<b>Test</b>
<b>Edad</b>	56 (49,75 , 64,25)	62 (57,75 , 69,25)	0,018	(c)
<b>Schirmer ( mm)</b>				
Visita 1	4 (1,75 , 5)	3 (2 , 4,25)	0,588	(c)
Visita 2	6 (2 , 17,25)	3 (2 , 5,5)	0,143	(c)
Visita 3	6 (2 , 12)	5,5 (2 , 10)	0,632	(c)
<b>BUT (seg)</b>				
Visita 1	4 (2 , 5)	4 (3 , 5)	0,250	(c)
Visita 2	5 (3,25 , 6,75 )	6 (5 , 8)	0,124	(c)
Visita 3	6 (5 , 8)	7,5 (5 , 10)	0,486	(c)
<b>Fluoresceína (Oxford)</b>				
Visita 1	3 (2 , 3)	3 (2 , 4)	0,207	(c)
Visita 2	1,5 (1 , 3)	2 (1 , 3)	0,355	(c)
Visita 3	2 (1 , 2)	1,5 (1 , 2)	0,797	(c)
<b>Verde lisamina (Bijsterveld)</b>				
Visita 1				
Visita 2	3 (2 , 4)	4 (3 , 5,25)	0,054	(c)
Visita 3	2,35 (1,26)	3,25 (2,09)	0,075	(b)
	2 (1 , 3)	3 (1,75 , 5)	0,093	(c)
<b>Cuestionario (Donate)</b>				
Visita 1				
Visita 2	39,81 (10,03)	41,63 (12,14)	0,649	(a)
Visita 3	30,31 (12,80)	30,42 (16,05)	0,985	(a)
	26,39 (14,17)	35,42 (17,09)	0,162	(a)

*Cuadro 6. Análisis de variables cuantitativas en dos grupos independientes en el global de individuos. (a) Test t-student asumiendo homogeneidad de varianzas. Se expresa en media (sd) (b) Test t-student cuando no se cumple homogeneidad de varianzas. Se expresa en media (sd) (c) Test U Mann Whitney - Wilcoxon. Se expresa en mediana IC (P25,P75).*

#### 4.2.2. Análisis de la variación de la tercera-primer visita

Al realizar un análisis de la variación de los resultados de la tercera visita comparada con la primera entre ambos sueros para el test de Schirmer, tiempo de rotura lagrimal, tinción de fluoresceína, verde lisamina y cuestionario, *no se encontraron diferencias significativas (cuadro 7).*

	<b>SA</b>	<b>SCU</b>	<b>p</b>	<b>Test</b>
<b>Schirmer</b> (mm)	1,5 (0 , 4)	1,5 (-0,25 , 5)	0,98	(c)
<b>BUT</b> (seg)	2,81 (2,21)	2,71 (2,579,)	0,89	(a)
<b>Fluoresceína</b> (Oxford)	-1 (-2 , -1)	-2 (-2 , 0)	0,42	(c)
<b>Verde lisamina</b> (Bijsterveld)	-0.89 (1,56)	-0.67 (3,12)	0,76	(b)
<b>Cuestionario</b> (Donate)	-15,15 (14,39)	-7,58 (11.56)	0,16	(a)

*Cuadro 7. Análisis de la variación (resultados tercera visita – resultados primera visita) en el global de individuos. Análisis de variables cuantitativas en dos grupos independientes. (a) Test t-student asumiendo homogeneidad de varianzas. Se expresa en media (sd) (b) Test t-student cuando no se cumple homogeneidad de varianzas. Se expresa en media (sd) (c) Test U Mann Whitney - Wilcoxon. Se expresa en mediana IC (P25,P75).*

### 4.2.3. Análisis ANOVA de medidas repetidas

En todos los valores evaluados (test de Schirmer, tiempo de rotura lagrimal, tinción de fluoresceína, verde lisamina y cuestionario) los resultados muestran que *existen diferencias significativas en las puntuaciones a lo largo del tiempo* en el análisis ANOVA de medidas repetidas, que a continuación se especifican para cada una de las pruebas efectuadas (cuadro 6).

#### 4.2.3.A. Test de Schirmer

Con el objeto de analizar si la variación del test Schirmer es la misma en los tres momentos considerados se aplica el test ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor. Al aplicar el test de Mauchly para analizar si la matriz de las varianzas es circular o esférica, condición necesaria en los modelos de medidas repetidas, obtenemos  $p = 0,0007$ , por tanto no se cumple condición de esfericidad. Al no cumplirse el requisito de esfericidad, utilizaremos un índice corrector llamado Epsilon obtenido según las estimaciones de Greenhouse-Geisser, según estos resultados: la variable tiempo obtenemos  $p = 0,012 < 0,05$ , por lo tanto los resultados apuntan a que las puntuaciones de Schirmer varían de forma significativa a lo largo del tiempo. En el caso del SA, de una media de 4 (1,75 – 5) mm en la primera visita mejoró a 6 (2 -12) mm en la visita 3 (cuadro 6). Con respecto al SCU, de una media de 3 (2 – 4,25) mm en la primera visita mejoró a 5,5 (2 -10) mm en la visita 3 (cuadro 6).

#### 4.2.3.B. BUT

Con el objeto de analizar si la variación de BUT es la misma en los tres momentos considerados se aplica el test ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor. Al calcular la prueba de esfericidad de Mauchly obtenemos  $p = 0,771 > 0,05$  y aceptamos por tanto la hipótesis de esfericidad. Cuando asumimos esfericidad obtenemos que la variable tiempo (momento factor) es significativo,  $p < 0,001$ , por lo que los resultados sugieren que las puntuaciones del BUT o tiempo de rotura lagrimal varían de forma significativa a lo largo del tiempo. En el caso del SA, de una media de 4 (2 – 5) segundos en la primera visita mejoró a 6 (5 -8) segundos en la visita 3 (cuadro 6). Con respecto al SCU, de una media de 4 (3 – 5) segundos en la primera visita mejoró a 7,5 (5 -10) segundos en la visita 3 (cuadro 6).

#### 4.2.3.C. Tinción con fluoresceína

Con el objeto de analizar si la variación en la tinción de la superficie ocular con fluoresceína es la misma en los tres momentos considerados se aplica el test ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor. Al aplicar el test de Mauchly para analizar si la matriz de las varianzas es circular o esférica, condición necesaria en los modelos de medidas repetidas, obtenemos  $p = 0,049$ , por tanto no se cumple condición de esfericidad. Al no cumplirse el requisito de esfericidad, utilizaremos un índice corrector llamado Epsilon obtenido según las estimaciones de Greenhouse-Geisser, según estos resultados: la variable tiempo obtenemos  $p < 0,001 < 0,05$ , por lo tanto los resultados apuntan a que las puntuaciones de la tinción con fluoresceína varían de forma significativa a lo largo del tiempo. En el caso del SA, de una media de puntuación de 3 (2 – 3) en la escala de Oxford en la primera visita disminuyó a 2 (1 - 2) puntos en la visita 3 (cuadro 6). Con respecto al SCU, de una media de puntuación de 3 (2 – 4) en la escala de Oxford en la primera visita disminuyó a 1,5 (1 - 2) puntos en la visita 3 (cuadro 6).

#### 4.2.3.D. Tinción con verde de lisamina

Con el objeto de analizar si la variación en la tinción de la superficie ocular

con verde de lisamina es la misma en los tres momentos considerados se aplica el test ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor. Al calcular la prueba de esfericidad de Mauchly obtenemos  $p = 0,29 > 0,05$  y aceptamos por tanto la hipótesis de esfericidad. Cuando asumimos esfericidad obtenemos que la variable tiempo (momento factor) es significativo,  $p < 0,012 < 0,05$ , por lo que los resultados indican que las puntuaciones de la tinción con verde de lisamina varían de forma significativa a lo largo del tiempo. En el caso del SA, de una media de puntuación de 3 (3 – 5) en la escala de van Bijsterveld en la primera visita disminuyó a 2 (1,25 – 4,75) puntos en la visita 3 (cuadro 6). Con respecto al SCU, de una media de puntuación en la escala de van Bijsterveld de 4,5 (3 – 6) en la primera visita disminuyó a 3 (2 – 4,75) puntos en la visita 3 (cuadro 6).

#### 4.2.3.E. Cuestionario

Con el objeto de analizar si la variación el cuestionario es la misma en los tres momentos considerados se aplica el test ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor. Al calcular la prueba de esfericidad de Mauchly obtenemos  $p = 0,0793 > 0,05$  y aceptamos por tanto la hipótesis de esfericidad. Por lo tanto cuando asumimos esfericidad obtenemos que la variable tiempo (momento factor) es significativo,  $p < 0,001 < 0,05$ , los resultados apuntan a que las puntuaciones del cuestionario varían de forma significativa a lo largo del tiempo. En el caso del SA, de una media de puntuación de 40 puntos en el cuestionario de Donate en la primera visita disminuyó a 28 puntos en la visita 3 (cuadro 6). Con respecto al SCU, de una media de puntuación en el cuestionario de Donate de 40 puntos en la primera visita disminuyó a 30 puntos en la visita 3 (cuadro 6).

#### 4.2.4. Análisis de los indicadores de mejoría para cada una de las pruebas

Para valorar la respuesta al tratamiento con cada uno de los sueros por separado, se consideró mejoría:

- a) Test de Schirmer: incremento de 3 mm.
- b) Tiempo rotura lagrimal: incremento 2 segundos.
- c) Fluoresceína: decremento de un área.

- d) Verde lisamina: decremento de dos puntos.
- e) Cuestionario: decremento de tres puntos.

Se aplicó un test de Fischer para comprobar si existe asociación entre el tratamiento que recibe el paciente y el valor de la respuesta. No se halló significación estadística para ninguno de los tests (cuadro 8):

- a) La mejoría en el test de Schirmer fue del 38,5% para SA y 37,5% para SCU, con una  $p = 1,00$ .
- b) La mejoría en el BUT fue del 69,2% para SA y 65,5% para SCU, con una  $p = 0,84$ .
- c) La mejoría en la tinción con fluoresceína fue del 80,8% para SA y 70,8% para SCU, con una  $p = 0,62$ .
- d) La mejoría en para la tinción con verde de lisamina fue del 34,6% para SA y 45,8% para SCU, con una  $p = 0,60$ .
- e) La mejoría en el cuestionario fue del 92,3% con el SA y 75% para SCU, con una  $p = 0,53$ .

Variable	Nivel de mejoría	SA	%	SCU	%	N todos	% todos
<b>Schirmer</b>	Incremento <3mm	16	61,5	15	62,5	31	62,0
	Incremento >3mm	10	38,5	9	37,5	19	38,0
	$p = 1,00$ Todos	26	100,0	24	100,0	50	100,0
<b>BUT</b>	Incremento <2sg	8	30,8	9	37,5	17	34,0
	Incremento >2sg	18	69,2	15	62,5	33	66,0
	$p = 0,84$ Todos	26	100,0	24	100,0	50	100,0
<b>Fluoresceína</b>	Descenso <1 unidad	5	19,2	7	29,2	12	24,0
	Descenso >1 unidad	21	80,8	17	70,8	38	76,0
	$p = 0,62$ Todos	26	100,0	24	100,0	50	100,0
<b>Verde Lisamina</b>	Descenso <2 puntos	17	65,4	13	54,2	30	60,0
	Descenso >2 puntos	9	34,6	11	45,8	20	40,0
	$p = 0,60$ Todos	26	100,0	24	100,0	50	100,0
<b>Cuestionario</b>	Descenso <3 puntos	1	7,7	3	25,0	4	16,0
	Descenso >3 puntos	12	92,3	9	75,0	21	84,0
	$p = 0,53$ Todos	13	100,0	12	100,0	25	100,0

Cuadro 8. Descriptivo indicadores mejora de cada uno de los tests.



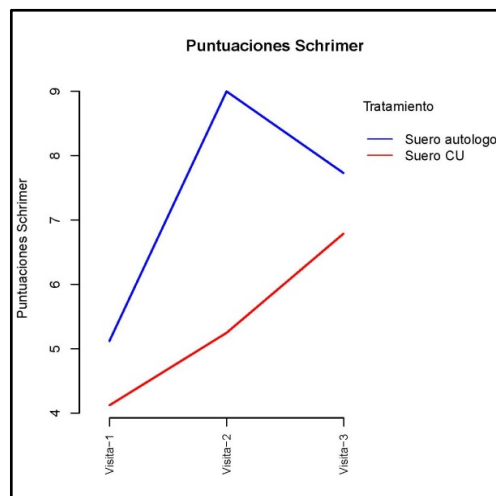
### 4.3. Comparación de la respuesta al tratamiento entre SA y SCU

Al comparar los resultados de ambos grupos de tratamiento para cada uno de las pruebas realizadas, los datos indicaron que no existen diferencias significativas entre SA y SCU para el test de Schirmer (cuadro 9), el BUT (cuadro 10), la tinción con fluoresceína (cuadro 11), ni la puntuación del cuestionario (cuadro 13). Sí se encontraron diferencias significativas en la tinción con verde de lisamina (cuadro 12), en la que el grupo tratado con SA obtiene mejores resultados es decir, menor puntuación (cuadro 6).

#### 4.3.1. Test de Schirmer

Al considerar el factor tratamiento (SA vs SCU) en la mejoría del test de Schirmer obtenemos una  $p = 0,268$ , por lo tanto no existen diferencias significativas entre ambos tratamientos.

El gráfico de perfil muestra las puntuaciones de Schirmer en cada uno de los momentos considerados en función del tratamiento (cuadro 9). Se observa que en la segunda visita las puntuaciones de Schirmer en el grupo tratado con suero de SA son más elevadas y que en la tercera visita las puntuaciones en este grupo descienden.

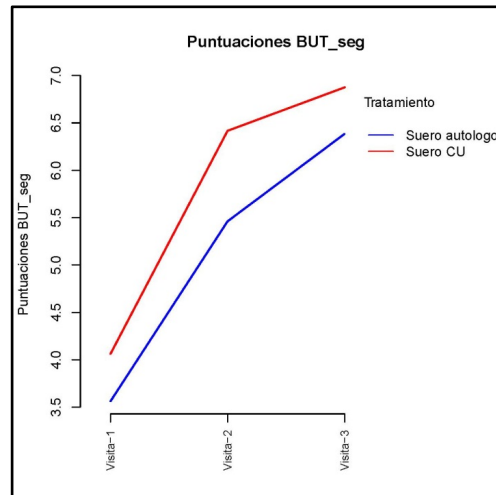


Cuadro 9. Comparación de las puntuaciones del test de Schirmer entre SA y SCU.

#### 4.3.2. BUT

Se evalúa el factor tratamiento (SA vs SCU) en la mejoría del BUT mediante el test ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor, no encontrándose un efecto significativo en función del tratamiento ( $p = 0,1610$ ).

El gráfico de perfil muestra las puntuaciones de BUT en cada uno de los momentos considerados en función del tratamiento (cuadro 10).

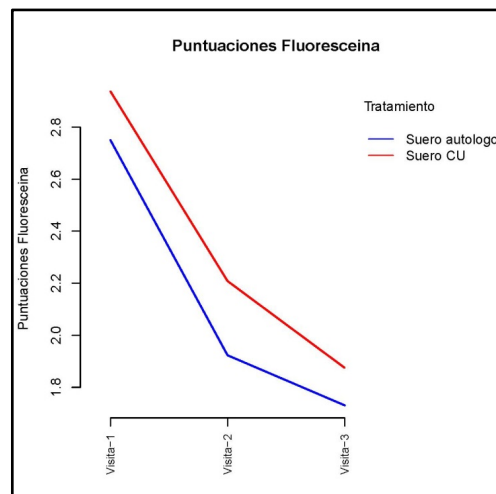


Cuadro 10. Comparación de las puntuaciones del test BUT entre SA y SCU.

#### 4.3.3. Tinción con fluoresceína

Se evalúa el factor tratamiento (SA vs SCU) en la mejoría del BUT mediante el test ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor, no encontrándose un efecto significativo en función del tratamiento ( $p = 0,925$ ).

El gráfico de perfil muestra las puntuaciones de fluoresceína en cada uno de los momentos considerados en función del tratamiento (cuadro 11).

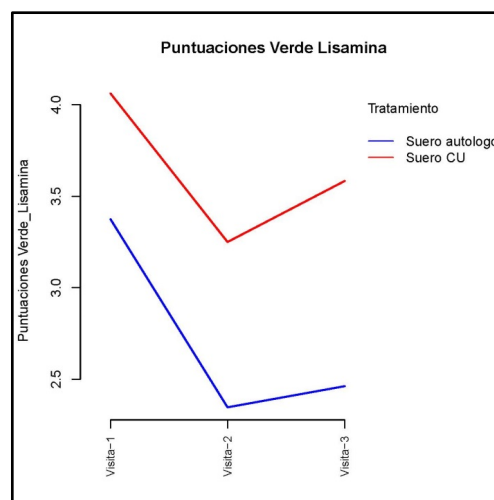


Cuadro 11. Comparación de las puntuaciones de la tinción con fluoresceína entre SA y SCU.

#### 4.3.4. Tinción con verde de lisamina

Se evalúa el factor tratamiento (SA vs SCU) en la mejoría de la tinción de la superficie ocular con verde de lisamina mediante el test ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor, encontrándose un efecto significativo en función del tratamiento ( $p = 0,0106$ ). Por lo tanto los datos pauntan a que en este caso sí existen diferencias significativas entre ambos tratamientos, siendo el SA más efectivo que el SCU.

El gráfico de perfil muestra las puntuaciones de verde de lisamina en cada uno de los momentos considerados en función del tratamiento (cuadro 12).

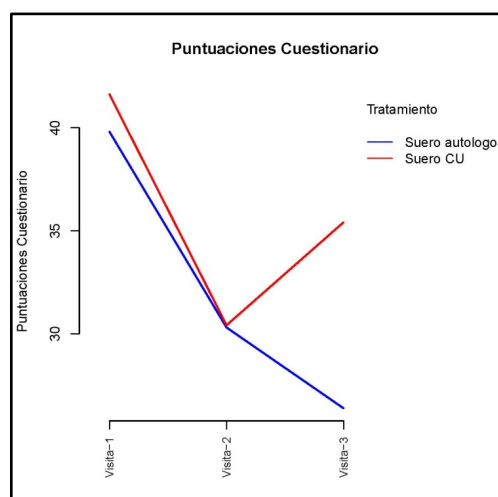


Cuadro 12. Comparación de las puntuaciones de la tinción con verde de lisamina entre SA y SCU.

#### 4.3.5. Cuestionario

Se evalúa el factor tratamiento (SA vs SCU) en la mejoría de la puntuación del mediante el test ANOVA de dos factores con medidas repetidas en un factor, no encontrándose un efecto significativo en función del tratamiento ( $p = 0,4502$ ).

El gráfico de perfil muestra las puntuaciones de cuestionario en cada uno de los momentos considerados en función del tratamiento (cuadro 13).



Cuadro 13. Comparación de las puntuaciones del cuestionario entre SA y SCU.

#### 4.4. Comparación en pacientes con tratamiento previo

El 38% de los ojos (12) del grupo tratado con SA y el 25% de los ojos (8) del grupo tratado con SCU (25%) usaban tratamiento previo con SA, todos mujeres con enfermedades autoinmunes previas (Tabla 6, cuadro 14). El resto de los datos demográficos de los pacientes con tratamiento previo se describen en el cuadro 14.

Variable	Categorías	SA	%	SCU	%	Ntotal	%total
Sexo	Hombre	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Mujer	12	100,0	8	100,0	20	100,0
	Todos	12	100,0	8	100,0	20	100,0
Enf. autoinmune	No	1	8,3	2	25,0	3	15,0
	Sí	11	91,7	6	75,0	17	85,0
	Todos	12	100,0	8	100,0	20	100,0
Trat previo	No	0	0,0	0	0,0	44	68,8
	Sí	12	100,0	8	100,0	20	31,2
	Todos	12	100,0	8	100,0	64	100,0
Menopausia	No	4	44,4	0	0,0	4	23,5
	Sí	5	55,6	8	100,0	13	76,5
	Todos	9	100,0	8	100,0	17	100,0

Cuadro 14. Datos demográficos de los pacientes con tratamiento previo al ensayo.

En el cuadro 15 se resume el análisis de variables cuantitativas para dos grupos independientes (SA y SCU) en individuos con tratamiento previo. Se analiza

la mejora con respecto a valores basales del test de Schirmer, BUT, tinción con fluoresceína, verde de lisamina y cuestionario. Los datos indican que *no hay diferencias entre los pacientes que empleaban previo al estudio SA y fueron asignados al grupo de SA y los que empleaban previo al estudio SA y fueron aleatorizados al grupo de SCU*.

El único valor significativo ( $p = 0,05$ ) fue la puntuación del cuestionario en la tercera visita para los pacientes del grupo del SA, que empleaban previamente SA previo al estudio.

	SA	SCU	<i>p</i>	Test
<b>Edad</b>	49 (46 , 55)	63,5 (57,75 , 69,25)	0,023	(c)
<b>Schirmer</b> (mm)				
Visita 1	2 (0 , 6,25)	2 (0,75 , 3,25)	0,782	(c)
Visita 2	1 (1 , 8,25)	1,5 (0,75 , 3,5)	0,660	(c)
Visita 3	2 (1 , 5,25)	3 (1 , 7,25)	1,000	(c)
<b>BUT</b> (seg)				
Visita 1	4 (2 , 4)	4 (3 , 4)	0,713	(c)
Visita 2	4,75 (2,55)	5,25 (1,98)	0,668	(a)
Visita 3	6,75 (2,12)	6,63 (2,2)	0,910	(a)
<b>Fluoresceína</b> (Oxford)				
Visita 1	2,67 (0,89)	3,25 (0,93)	0,058	(a)
Visita 2	2,63 (1,41)	3,13 (1,13)	0,446	(a)
Visita 3	2 (1,75 , 2)	2 (1,75 , 2)	0,952	(c)
<b>Verde lisamina</b> (Bijsterveld)				
Visita 1	4,33 (1,61)	5 (1,51)	0,336	(a)
Visita 2	3 (2 , 3)	4 (2 , 6)	0,228	(c)
Visita 3	4,38 (2,72)	3,13 (2,1)	0,321	(a)
<b>Cuestionario</b> (Donate)				
Visita 1	38,83 (11,81)	53,00 (9,56)	0,649	(a)
Visita 2	31,50 (8,66)	42,75 (9,00)	0,985	(a)
Visita 3	26,5 (13,92)	47,25 (9,00)	<b>0,005</b>	(a)

*Cuadro 15. Análisis de variables cuantitativas en dos grupos independientes en individuos con tratamiento previo. Análisis de variables cuantitativas en dos grupos independientes en el global de individuos. (a) Test t-student asumiendo homogeneidad de varianzas. Se expresa en media (sd) (b) Test t-student cuando no se cumple homogeneidad de varianzas. Se expresa en media (sd) (c) Test U Mann Whitney - Wilcoxon. Se expresa en mediana IC (P25,P75). En negrita el único valor significativo.*

Al realizar un análisis de la variación de los resultados de la tercera visita comparada con la primera entre los pacientes tratados previamente con SA en ambos sueros para los test oftalmológicos objetivos y el cuestionario, los datos indican que no existen diferencias significativas (cuadro 16).

	<b>SA</b>	<b>SCU</b>	<b>p</b>	<b>Test</b>
<b>Schirmer</b> (mm)	2,75 (2,49)	2 (2,67)	0,571	(a)
<b>BUT</b> (seg)	4,5 (3,5 , 5)	2 (1 , 4,5)	0,456	(c)
<b>Fluoresceína</b> (Oxford)	-1 (-1,25 , -1)	-2 (-2 , -0,75)	0,373	(c)
<b>Verde lisamina</b> (Bijsterveld)	0 (-0,25 , 0,5)	-3 (-4 , -1,75)	0,070	(c)
<b>Cuestionario</b> (Donate)	-16 (12,25)	-5,75 (1,71)	0,193	(b)

*Cuadro 16. Análisis de la variación (resultados tercera visita – resultados primera visita) en individuos con tratamiento previo. Análisis de variables cuantitativas en dos grupos independientes. (a) Test t-student asumiendo homogeneidad de varianzas. Se expresa en media (sd) (b) Test t-student cuando no se cumple homogeneidad de varianzas. Se expresa en media (sd) (c) Test U Mann Whitney - Wilcoxon. Se expresa en mediana IC (P25,P75).*

#### 4.5. Comparación en pacientes con enfermedades autoinmunes

El 67% (44 ojos) de los sujetos presentaba enfermedad autoinmune previa (tabla 6, cuadro 4), de los cuales el 86% eran mujeres. El resto de los datos demográficos de los pacientes con enfermedad autoinmune se describen en el cuadro 17.

<b>Variable</b>	<b>Categorías</b>	<b>SA</b>	<b>%</b>	<b>SCU</b>	<b>%</b>	<b>Ntotal</b>	<b>%total</b>
<b>Sexo</b>	Hombre	0	0,0	6	27,3	6	13,9
	Mujer	21	100,0	16	72,7	37	86,0
	Todos	21	100,0	22	100,0	43	100,0
<b>Trat previo</b>	No	10	47,6	16	72,7	26	60,5
	Sí	11	52,4	6	27,3	17	39,5
	Todos	21	100,0	22	100,0	43	100,0
<b>Menopausia</b>	No	6	31,6	2	12,5	8	22,9
	Sí	13	68,4	14	87,5	27	77,1
	Todos	19	100,0	16	100,0	35	100,0

*Cuadro 17. Datos demográficos de los pacientes con enfermedades autoinmunes.*

Las enfermedades autoinmunes que mostraban los pacientes fueron:

- Síndrome de Sjögren primario: 18 ojos (9 pacientes).
- Síndrome de Sjögren secundario:
  - Artritis reumatoide: 18 ojos (9 pacientes).
  - Sarcoidosis: 2 ojos (1 paciente).
  - Otras enfermedades del espectro reumatológico/auto-inmune:

- Patología tiroidea autoinmune (tiroiditis de Hashimoto): 2 ojos (1 paciente).
- Enfermedad de Raynaud: 2 ojos (1 paciente).
- Espondiloartrosis: 2 ojos (1 paciente).

En el cuadro 18 se resume el análisis de variables cuantitativas para dos grupos independientes (SA y SCU) en individuos con enfermedades autoinmunes. Para determinar si existen diferencias en la respuesta clínica según el suero empleado, se analiza la mejora con respecto a valores basales para test de Schirmer, BUT, tinción con fluoresceína, verde de lisamina y cuestionario. *Los análisis estadísticos indican que no existen diferencias entre los pacientes que presentaban enfermedad autoinmune y fueron asignados al grupo de SA y los que fueron aleatorizados al grupo de SCU.* El único valor con significación estadística ( $p = 0,003$ ) fue la edad de los pacientes.

Al realizar un análisis de la variación de los resultados de la tercera visita comparada con la primera entre los pacientes con enfermedades autoinmunes en ambos sueros para el test de Schirmer, tiempo de rotura lagrimal, tinción de fluoresceína, verde lisamina y cuestionario, los datos no mostraron diferencias significativas (cuadro 19).

	<b>SA</b>	<b>SCU</b>	<b>p</b>	<b>Test</b>
<b>Edad</b>	56 (46 , 60)	69 (57,25 ,70,75)	0,003	(c)
<b>Schirmer (mm)</b>				
Visita 1	3 (0 , 5)	2,5 (1,25 , 4)	1,000	(c)
Visita 2	3 (1,25 , 16,5)	2,5 (1,25 , 4,75)	0,453	(c)
Visita 3	4 (2 , 11,5)	2,5 (1,25 , 11,25)	0,712	(c)
<b>BUT (seg)</b>				
Visita 1	4 (3 , 5)	4 (4 , 5)	0,210	(c)
Visita 2	5,17 (2,18)	6,5 (2,09)	0,070	(a)
Visita 3	6,61 (2,03)	6,17 (2,73)	0,583	(a)
<b>Fluoresceína (Oxford)</b>				
Visita 1	3 (2 , 3)	3 (2 , 3)	0,795	(c)
Visita 2	2 (1 , 3)	2 (1 , 2,75)	0,646	(c)
Visita 3	2 (1 , 2)	2 (1 , 2,75)	0,987	(c)
<b>Verde lisamina (Bijsterveld)</b>				
Visita 1	3 (3 , 5)	4,5 (3 , 6)	0,229	(c)
Visita 2	3 (1,25 , 3)	4 (2 , 5,75)	0,082	(c)
Visita 3	2 (1,25 , 4,75)	3 (2 , 4,75)	0,608	(c)
<b>Cuestionario (Donate)</b>				
Visita 1	40,55 (10,93)	40,27 (11,93)	0,956	(a)
Visita 2	28,89 (10,79)	26,89 (14,62)	0,746	(a)
Visita 3	27,56 (14,40)	30,44 (15,49)	0,687	(a)

Cuadro 18. Análisis de variables cuantitativas en dos grupos independientes en individuos con enfermedades autoinmunes. (a) Test *t*-student asumiendo homogeneidad de varianzas. Se expresa en media (sd) (b) Test *t*-student cuando no se cumple homogeneidad de varianzas. Se expresa en media (sd) (c) Test U Mann Whitney - Wilcoxon. Se expresa en mediana IC (P25,P75).

	<b>SA</b>	<b>SCU</b>	<b>p</b>	<b>Test</b>
<b>Schirmer (mm)</b>	2,5 (0,25 , 6)	1 (0 , 8)	0,589	(c)
<b>BUT (seg)</b>	4 (2,25 , 4,75)	1,5 (1 , 4)	0,224	(c)
<b>Fluoresceína (Oxford)</b>	-1 (-2 , -1)	-1 (-2 , 0)	0,934	(c)
<b>Verde lisamina (Bijsterveld)</b>	0 (-1 , 0)	-1 (-3,75 , 0,75)	0,419	(c)
<b>Cuestionario (Donate)</b>	-15 (11,60)	-9,56 (12,02)	0,343	(a)

Cuadro 19. Análisis de la variación (resultados tercera visita – resultados primera visita) en individuos con tratamiento previo. (a) Test *t*-student asumiendo homogeneidad de varianzas. Se expresa en media (sd) (b) Test *t*-student cuando no se cumple homogeneidad de varianzas. Se expresa en media (sd) (c) Test U Mann Whitney - Wilcoxon. Se expresa en mediana IC (P25,P75).



#### 4.6. Comparación de la concentración de las moléculas

Se determinó la concentración de albúmina (g/dl), fibronectina ( $\mu\text{g/ml}$ ), IgA (mg/dl), IgG (mg/dl), IgM (mg/dl), vitamina A ( $\mu\text{g/dl}$ ), vitamina E ( $\mu\text{g/dl}$ ), EGF (ng/dl) y TGF (ng/dl):

- En 15 muestras de SA para todas las moléculas, excepto para vitamina E, TGF y EGF, en el que se analizó en las 14 muestras disponibles.
- En 8 SCU procedentes de donantes (sueros elaborados a partir de la misma donante se emplearon para varios pacientes).

El valor medio de cada molécula, la desviación típica y el error típico de la media para ambos sueros se muestran en el cuadro 20. Para comparar si las concentraciones de dichos componentes eran similares en ambos sueros se empleó la comparación de medias con la prueba T para muestras independientes, empleando la prueba de Levene para evaluar si existe o no homocedasticidad entre las muestras de ambos sueros. *Se hallaron diferencias estadísticamente significativas en todas las moléculas a favor del SA (cuadro 20).*

						Prueba de Levene para la igualdad de varianzas			Prueba T para la igualdad de medias	
Molécula	Suero	N	Media	Desviación típica	Error típico de la media	¿Homoce- dasticidad?	F	Signifi- cación	t	Signifi- cación
Albumina	Autólogo	15	3,87	0,66	0,17	Si	0,01	0,082	6,06	<b>0,00</b>
	Cordón	8	2,24	0,50	0,17	No			6,60	0,00
Fibronec- tina	Autólogo	15	255,13	185,30	49,52	Si	3,68	0,069	2,42	<b>0,025</b>
	Cordón	8	92,49	41,09	14,52	No			3,15	0,07
IgA	Autólogo	15	344,46	232,92	60,13	Si	10,04	0,005	4,03	0,01
	Cordón	8	8,43	6,69	2,36	No			5,58	<b>0,00</b>
IgG	Autólogo	15	1.662,53	1.066,25	275,30	Si	5,25	0,032	2,49	0,021
	Cordón	8	705,62	199,33	70,47	No			3,37	<b>0,004</b>
IgM	Autólogo	15	142,02	87,56	22,60	Si	14,79	0,001	4,26	0,000
	Cordón	8	8,43	6,12	2,16	No			5,88	<b>0,000</b>
Vitamina A	Autólogo	15	42,60	15,37	3,96	Si	12,26	0,02	5,41	0,000
	Cordón	8	12,12	4,85	1,71	No			7,04	<b>0,000</b>
Vitamina E	Autólogo	14	1.556,26	344,96	80,06	Si	11,69	0,003	10,6 8	0,000
	Cordón	8	230,50	52,93	18,71	No			14,5 6	<b>0,000</b>
TGF	Autólogo	14	21,18	5,66	1,51	Si	5,97	0,024	8,14	0,000
	Cordón	7	3,04	1,90	0,72	No			10,8 0	<b>0,000</b>
EGF	Autólogo	14	0,81	0,56	0,15	Si	2,55	0,126	3,25	<b>0,004</b>
	Cordón	8	0,13	0,24	0,08	No			3,95	0,01

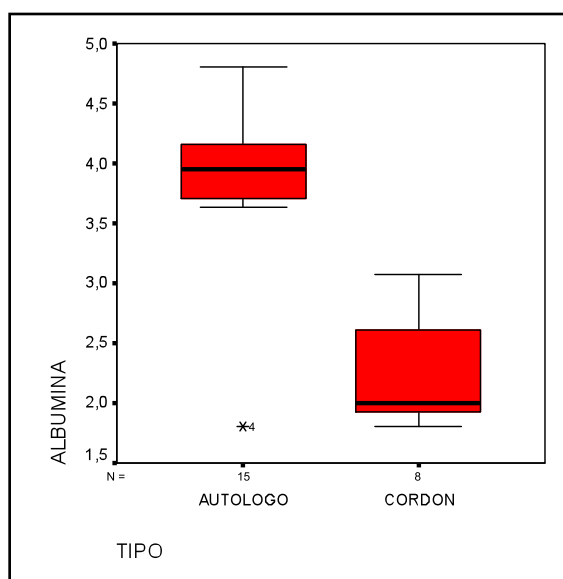
Cuadro 20. Datos estadísticos para la concentración de las distintas moléculas en los sueros. Comparación de medias con la prueba T para muestras independientes de las concentraciones de las distintas moléculas entre ambos sueros. Los valores de la última columna en negrita señalan las diferencias significativas.

## 4.7. Valores de las moléculas

Se representan los valores de las moléculas mediante diagramas de cajas, que proporcionan información sobre los valores mínimo y máximo, los cuartiles Q1, Q2 o mediana y Q3, la existencia de valores atípicos y la simetría de la distribución.

### a) Albúmina

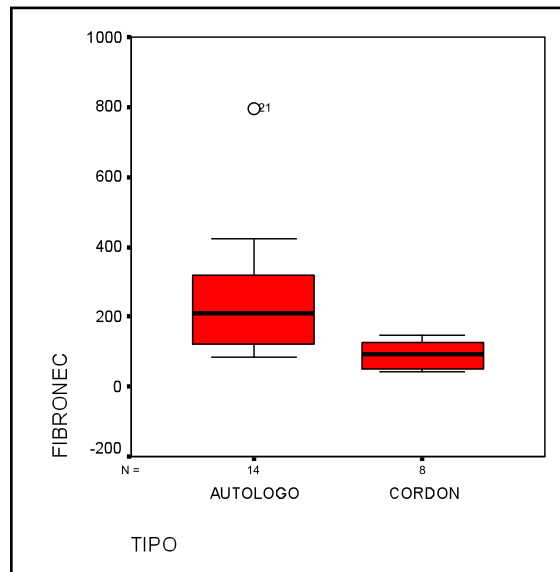
- La media de concentración en SA fue de 3,87 g/dl, con una desviación típica de 0,66 y un error típico de la media de 0,17 (cuadro 20).
- La media de concentración en SCU fue de 2,24 g/dl con una desviación típica de 0,50 y un error típico de la media de 0,17 (cuadro 20).
- En la prueba T para igualdad de medias, asumiendo varianzas iguales, hubo una significación de  $p = 0,0001$  (cuadro 20).



Cuadro 21. Diagrama de cajas de las concentraciones de albúmina entre ambos sueros.

### b) Fibronectina

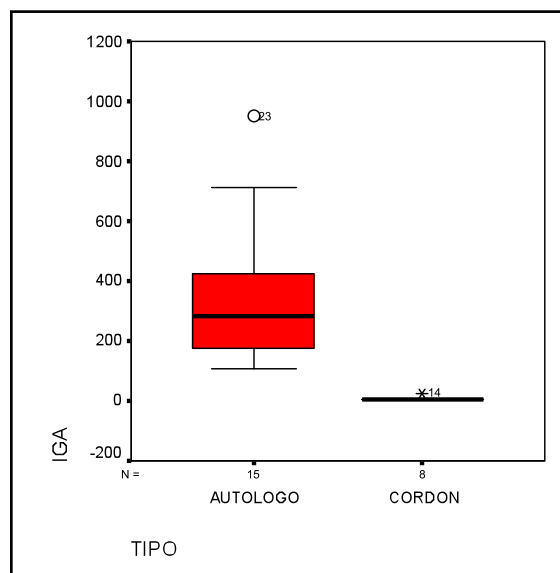
- La media de concentración en SA fue de 255,13  $\mu\text{g/ml}$  con una desviación típica de 185,30 y un error típico de la media de 49,52 (cuadro 20).
- La media de concentración en SCU fue de 92,49  $\mu\text{g/ml}$  con una desviación típica de 41,09 y un error típico de la media de 14,52 (cuadro 20).
- En la prueba T para igualdad de medias, asumiendo varianzas iguales, hubo una significación de  $p = 0,025$  (cuadro 20).



Cuadro 22. Diagrama de cajas de las concentraciones de fibronectina entre ambos sueros.

c) IgA

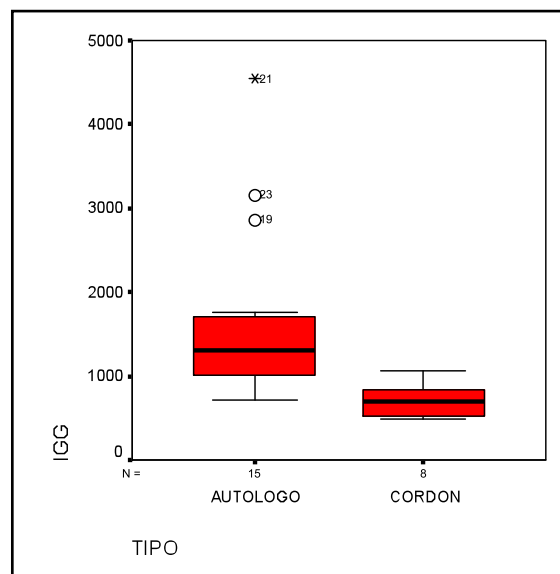
- La media de concentración en SA fue de 344,46 mg/dl con una desviación típica de 232,92 y un error típico de la media de 60,13 (cuadro 20).
- La media de concentración en SCU fue de 8,43 mg/dl con una desviación típica de 6,69 y un error típico de la media de 2,36 (cuadro 20).
- En la prueba T para igualdad de medias, sin asumir varianzas iguales, hubo una significación de  $p = 0,0001$  (cuadro 20).



Cuadro 23. Diagrama de cajas de las concentraciones de IgA entre ambos sueros.

d) IgG

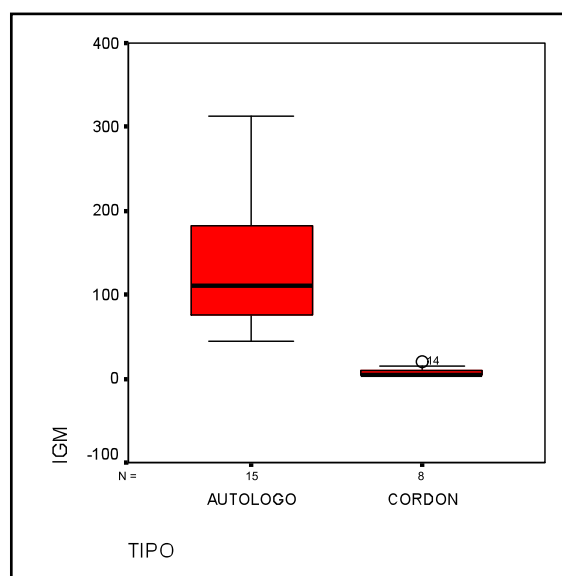
- La media de concentración en SA fue de 1.663,53 mg/dl con una desviación típica de 1.066,25 y un error típico de la media de 275,30 (cuadro 20).
- La media de concentración en SCU fue de 705,62 mg/dl con una desviación típica de 199,33 y un error típico de la media de 70,47 (cuadro 20).
- En la prueba T para igualdad de medias, sin asumir varianzas iguales, hubo una significación de  $p = 0,04$  (cuadro 20).



Cuadro 24. Diagrama de cajas de las concentraciones de IgG entre ambos sueros.

e) IgM

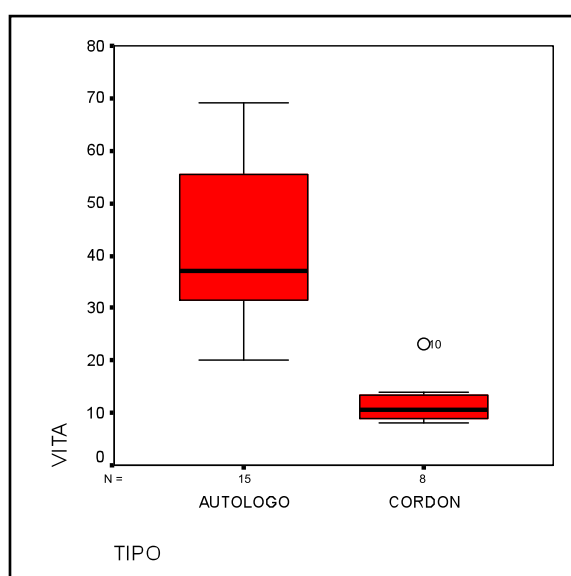
- La media de concentración en SA fue de 142,02 mg/dl con una desviación típica de 87,56 y un error típico de la media de 22,60 (cuadro 20).
- La media de concentración en SCU fue de 8,43 mg/dl con una desviación típica de 6,12 y un error típico de la media de 2,16 (cuadro 20).
- En la prueba T para igualdad de medias, sin asumir varianzas iguales, hubo una significación de  $p = 0,0001$  (cuadro 20).



Cuadro 25. Diagrama de cajas de las concentraciones de IgM entre ambos sueros.

#### f) Vitamina A

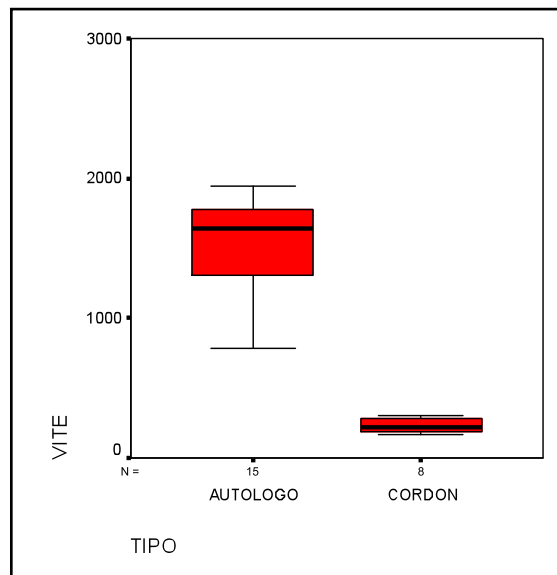
- La media de concentración en SA fue de 42,60  $\mu\text{g/dl}$  con una desviación típica de 15,37 y un error típico de la media de 3,96 (cuadro 20).
- La media de concentración en SCU fue de 12,12  $\mu\text{g/dl}$  con una desviación típica de 4,85 y un error típico de la media de 1,71 (cuadro 20).
- En la prueba T para igualdad de medias, sin asumir varianzas iguales, hubo una significación de  $p = 0,0001$  (cuadro 20).



Cuadro 26. Diagrama de cajas de las concentraciones de vitamina A entre ambos sueros.

g) Vitamina E

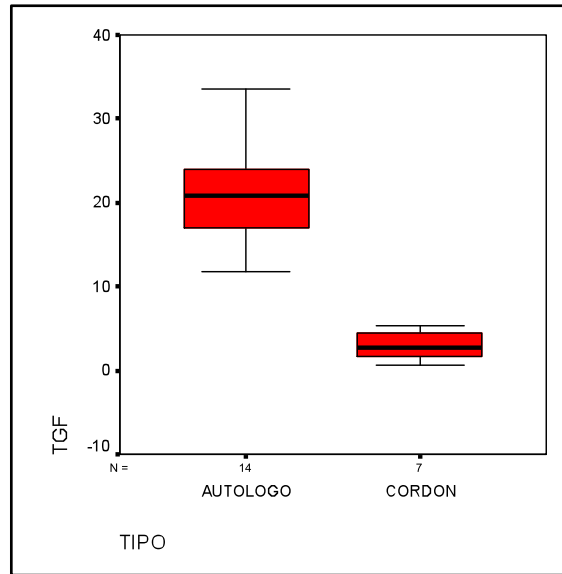
- La media de concentración en SA fue de 1.556,26 µg/dl con una desviación típica de 344,96 y un error típico de la media de 89,06 (cuadro 20).
- La media de concentración en SCU fue de 230,50 µg/dl con una desviación típica de 52,93 y un error típico de la media de 18,71 (cuadro 20).
- En la prueba T para igualdad de medias, sin asumir varianzas iguales, hubo una significación de  $p = 0,0001$  (cuadro 20).



Cuadro 27. Diagrama de cajas de las concentraciones de vitamina E entre ambos sueros.

h) TGF

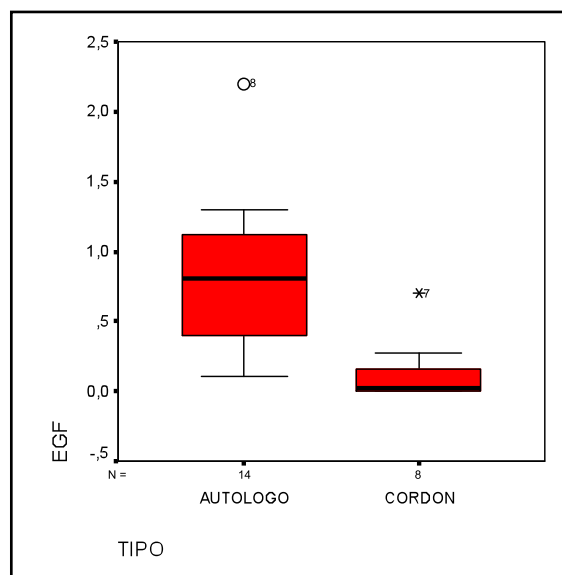
- La media de concentración en SA fue de 21,18 ng/dl con una desviación típica de 5,66 y un error típico de la media de 1,51 (cuadro 20).
- La media de concentración en SCU fue de 3,04 ng/dl con una desviación típica de 1,90 y un error típico de la media de 0,72 (cuadro 20).
- En la prueba T para igualdad de medias, sin asumir varianzas iguales, hubo una significación de  $p = 0,0001$  (cuadro 20).



Cuadro 28. Diagrama de cajas de las concentraciones de vitamina TGF entre ambos sueros.

i) EGF

- La media de concentración en SA fue de 0,81 ng/dl con una desviación típica de 0,56 y un error típico de la media de 0,15 (cuadro 20).
- La media de concentración en SCU fue de 0,13 ng/dl con una desviación típica de 0,24 y un error típico de la media de 0,08 (cuadro 20).
- En la prueba T para igualdad de medias, asumiendo varianzas iguales, hubo una significación de  $p = 0,04$  (cuadro 20).



Cuadro 29. Diagrama de cajas de las concentraciones de vitamina EGF entre ambos sueros.



## Discusión y *discussion*

# 5. Discusión

## 5.1. Datos demográficos

En el presente estudio se reclutaron y aleatorizaron 64 ojos de 32 pacientes, todos de raza caucásica, con SOS moderado-severo para determinar el efecto del SA y el SCU, medido mediante las pruebas de Schirmer, BUT, tinción con fluoresceína, verde de lisamina y cuestionario al mes y a los tres meses de comenzar el tratamiento.

Yoon (174) comparó 92 ojos de 48 pacientes con SOS moderado-severo, de los cuales trató 41 ojos de 21 pacientes con SA y 51 ojos de 27 pacientes con SCU. Realizó test de Schirmer, BUT, tinción con fluoresceína, aclaramiento lagrimal, estesiometría corneal y cuestionario, al mes y a los dos meses de comenzar el tratamiento.

Por su parte, Versura (175) empleó SCU en 59 ojos 30 pacientes, 33 con EICH y 26 con síndrome de Sjögren que tenían un grado 4 o más en la escala de Oxford. Realizó test de Schirmer, BUT, tinción con fluoresceína de los defectos epiteliales, estesiometría corneal y cuestionarios de síntomas, satisfacción y tolerabilidad, al inicio y al mes de comenzar el tratamiento.

La mayoría de los pacientes del presente estudio eran de sexo femenino: 56 pacientes, el 86% del total, con un ratio femenino/masculino para el grupo del SA de 32:0 y un ratio de 24:8 (3:1) para el grupo tratado con SCU. La edad media de los pacientes de nuestro trabajo fue de 61,5 años (rango 44 - 88). La edad media fue de 56 años (rango 45,9 - 64) en el grupo tratado con SA y de 62 años (rango 57,75 – 69,25) en el grupo tratado con SCU. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p = 0,010$ ).

El trabajo de Yoon (174), sin embargo, presenta un grupo más homogéneo, con un mayor porcentaje de varones: el ratio femenino/masculino para los pacientes tratados con SA es de 11:10 y un ratio de 15:12 para los tratados con SCU. Asimismo, Yoon (174) presenta en su trabajo un grupo de pacientes más jóvenes: la

edad media fue de 39,95 años (rango 20 - 59) y de 41,96 años (rango 20 – 61) para los ojos que recibieron tratamiento con SA y SCU, respectivamente.

Versura (174) presenta 59 ojos, de 19 de mujeres y 11 hombres. El grupo con síndrome de Sjögren estaba formado únicamente por mujeres con una edad media de  $59,6 \pm 13,1$  años. El afecto de EICH tenía mayor proporción de varones (11 versus 6 mujeres) y menor edad promedio:  $38,8 \pm 5,8$  años.

La epidemiología habitual del SOS afecta más frecuentemente a mujeres post-menopáusicas, ancianos y pacientes con enfermedades autoinmunes (66-71). Mientras el subgrupo de síndrome de Sjögren de Versura (174) y los pacientes de nuestro estudio se aproximan más a dicho perfil, los datos demográficos de los pacientes del trabajo de Yoon (174) son poco coherentes con la epidemiología del ojo seco, incluso teniendo en cuenta la raza asiática y concretamente la coreana, donde el autor realizó su estudio (181).

## 5.2. Respuesta al tratamiento del ojo seco

Al analizar la respuesta clínica al empleo de SA y SCU, medida por el cambio producido por la terapia en el test de Schirmer (mm), el BUT (segundos), la tinción de fluoresceína de la superficie ocular (medida según la escala de Oxford), la tinción con verde lisamina del epitelio córneo-conjuntival (evaluada según la escala de van Bijsterveld) y la puntuación del cuestionario de Donate (104), se evidencia que existen diferencias significativas en las puntuaciones a lo largo del tiempo en los análisis de medidas repetidas, es decir, ambos sueros mejoran el estado de la superficie ocular, a partir del primer mes y hasta el final del tratamiento.

Los efectos del SA sobre la superficie ocular son bien conocidos. Casi todos los autores observan una mejoría subjetiva considerable sólo después de 48 horas de iniciado el tratamiento (23,165,166): Tsubota (158) y Poon (162) hallan mejoría en los síntomas, la tinción con fluoresceína (165) y el test de Schirmer, que desaparecen tras cuatro semanas de suspender la aplicación. Otros autores encontraron pocos efectos sobre el test de Schirmer con el SA (5,23,158). Kojima (164) encuentra mejoría en el BUT de pacientes tratados con SA al compararlos

con el uso de humectantes comerciales. Se ha descrito una disminución en el área teñida con fluoresceína tras el uso de SA (162,165).

Yoon (174) y Versura (175) han empleado el SCU para el tratamiento del SOS. Yoon (174) encuentra mejoría en el cuestionario, BUT, tinción con fluoresceína al mes y los dos meses de tratamiento, tanto con SA como con SCU. Versura (175) describe cambios positivos en el test de Schirmer, el BUT, la osmolaridad lagrimal, la metaplasia conjuntival y el cuestionario con SCU.

### 5.3. Comparación del efecto de SA y SCU

Los resultados del presente estudio muestran que el SCU no es inferior al SA:

- Al comparar los resultados de ambos grupos de tratamiento para cada uno de los tests, se concluye que no existen diferencias significativas entre SA y SCU para el test de Schirmer, el BUT y la tinción con fluoresceína.
- Sí se encontraron diferencias significativas en la tinción con verde de lisamina, en la que el grupo tratado con SA obtiene mejores resultados (es decir, menor puntuación), pero no parece un resultado relevante dado que partía de mejores valores basales en la primera visita.
- Al realizar un análisis de la variación de los resultados de la tercera comparada con la primera visita entre ambos sueros para el test de Schirmer, tiempo de rotura lagrimal, tinción de fluoresceína, verde lisamina y cuestionario, se concluye que no existen diferencias significativas entre ambos tratamientos.

Yoon (174) describe que ambos sueros mostraron mejoría en los síntomas, el BUT, la tinción corneal y la citología de impresión conjuntival (en SA, sólo en los pacientes sin síndrome de Sjögren), siendo más efectivo el SCU que el SA en la mejora del cuestionario, curación de la querato-epiteliopatía y mejora de la población de células caliciformes conjuntivales. Por su parte, Shen (182) halló que el SCU era superior al SA en la proliferación y diferenciación de las células epiteliales.

## 5.4. Pacientes con tratamiento previo

Había 12 ojos (38%) del grupo tratado con SA y 8 ojos (25%) del grupo tratado con SCU que usaban tratamiento previo con SA, todas mujeres con enfermedades autoinmunes previas. Tras un periodo de lavado de aproximadamente tres semanas empleando lágrimas artificiales y geles comerciales, se incluyeron en el ensayo.

Al realizar el análisis estadístico se concluye que no hay diferencias entre los pacientes que empleaban previo al estudio SA y fueron asignados al grupo de SA y los que empleaban previo al estudio SA y fueron aleatorizados al grupo de SCU.

Curiosamente, el único valor significativo ( $p = 0,046$ ) fue la puntuación del cuestionario en la tercera visita, que era inferior (por tanto, mejor) en los pacientes del grupo del SA que empleaban previamente SA. Puede que este hecho se deba al efecto Hawthorne o sesgo de participación en ensayos clínicos.

## 5.5. Pacientes con enfermedad autoinmune

El 67% de los pacientes de nuestro estudio presentaban enfermedad autoinmune previa, el 86% de los cuales eran mujeres. Las enfermedades más frecuentes fueron el síndrome de Sjögren primario (18 ojos, 9 pacientes) y la artritis reumatoide (18 ojos, 9 pacientes).

Estos valores son coherentes con los estudios de prevalencia publicados (67), en los que los pacientes con enfermedades autoinmunes presentaban con mayor frecuencia síntomas de ojo seco, y de los que el 78% eran de sexo femenino. Yoon (174), por su parte, presenta en su trabajo un 37% de pacientes con enfermedad de Sjögren (es la única enfermedad autoinmune que contempla), de los cuales el 77% eran mujeres.

El SOS secundario al síndrome de Sjögren es uno de los más graves y resistentes al tratamiento (167). Tsubota (158) señala que el SA por presentar características bioquímicas y biomecánicas similares a la lágrima, ser hipoalergénico y aportar factores tróficos a la superficie ocular, es el tratamiento de

elección en el SOS grave secundario al síndrome de Sjögren, ya que en éste, por encontrarse tanto la producción basal como refleja de lágrima muy disminuidas, es necesario aportar exógenamente los factores tróficos para mantener la integridad de la superficie ocular. Por su parte, Noble (23) y Kojima (157) en sus estudios randomizados y prospectivos empleando SA en pacientes con síndrome de Sjögren, sólo encuentran mejoría en la sintomatología y en la citología de impresión conjuntival.

Previo a la realización de este trabajo, nos planteábamos si el padecimiento de enfermedades autoinmunes o el hecho de estar en tratamiento con fármacos inmunosupresores podía poner en tela de juicio la calidad y eficacia del SA de dichos pacientes, debido a que, como ocurre con otras sustancias tróficas, la concentración plasmática de factores de crecimiento se halla disminuida en estos pacientes (174,175,183-186). Sin embargo, al realizar el análisis estadístico se concluye que no hay diferencias entre los pacientes que presentaban enfermedad autoinmune y fueron asignados al grupo de SA y los que fueron aleatorizados al grupo de SCU. El único valor estadísticamente significativo ( $p = 0,003$ ) fue la edad de los pacientes.

Yoon (174), sin embargo, encuentra que el SCU era más efectivo en los pacientes con síndrome de Sjögren (es la única enfermedad autoinmune que incluye en su trabajo). En su publicación describe que el tratamiento con SCU obtenía mejores resultados en la sintomatología, la tinción corneal y la citología de impresión conjuntival en pacientes con síndrome de Sjögren que el SA. Versura (175) estudió ojos con defectos epiteliales persistentes en pacientes con síndrome de Sjögren y EICH. Refiere que tras un mes de tratamiento con SCU, el test Schirmer, el BUT, la osmolaridad lagrimal, la estesiometría, la metaplasia conjuntival y la puntuación del cuestionario mejoraron de manera significativa.

## 5.6. Concentración de moléculas

Se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de todas las moléculas a favor del SA: albúmina (g/dl), fibronectina ( $\mu\text{g/ml}$ ), IgA

(mg/dl), IgG (mg/dl), IgM (mg/dl), vitamina A ( $\mu\text{g/dl}$ ), vitamina E ( $\mu\text{g/dl}$ ), EGF (ng/dl) y TGF (ng/dl).

Sin embargo, la literatura previa al inicio de este estudio, del que partió la hipótesis del mismo (174) y posteriores trabajos (175,187,188), es que la concentración de factores de crecimiento era mayor en el SCU que en el SA (excepto la vitamina A).

Concretamente, Yoon y Versura (28,173-175,187) describen:

a) Moléculas cuyas concentraciones eran superiores en SCU que en SA eran:

- EFG y TGF $\beta$ , tres veces y dos veces más, respectivamente.
- Otros factores de crecimiento no valorados en el estudio presente: NGF y VEGF.
- La sustancia P.

b) Moléculas cuyas concentraciones eran inferiores en SCU que en SA eran:

- El IGF (tampoco cuantificado en este estudio).
- La vitamina A. Aunque en menor concentración en el SCU, era superior a la presente en la lágrima endógena y suficiente para prevenir metaplasia escamosa.

El Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Málaga posee el banco de cordón más grande de Europa en unidades almacenadas. En principio descartamos problemas asociados a la técnica de preparación de los colirios, porque en el caso de los colirios de SA, se obtienen valores similares a los descritos por otros autores (157, 161,174,175,187).

Concretamente, al contrastar los valores medios de las muestras de SA de nuestro estudio con las concentraciones publicadas por Geerling (157), resultan en general comparables, salvo la concentración de IgA, que es mucho mayor las muestras de SA de nuestro trabajo. Los valores concretos de la moléculas comparadas se muestran resumidas en la tabla 7.

Sin embargo, las concentraciones de la moléculas en el SCU de nuestras muestras son inferiores a la del SA, al contrario de lo que cabría esperar según lo publicado en la literatura (28,173-175,187), con excepción de la vitamina A, cuya concentración era esperable que fuese menor.

	Nuestro estudio	Geerling (157)
<b>EGF (ng/ml)</b>	0,81	0,5
<b>TGF-<math>\beta</math> (ng/ml)</b>	21,10 ( $\pm$ 5,66)	6-33
<b>Vitamina A (mg/ml)</b>	42,60 ( $\pm$ 15,37)	46
<b>IgA (mg/dl)</b>	344,46 ( $\pm$ 232,92)	2
<b>Fibronectina (<math>\mu</math>g/ml)</b>	255 ( $\pm$ 185,30)	205

Tabla 7. Comparación de los valores medios de diversas moléculas entre el SA de nuestras muestras y los publicados por Geerling (157).

Este hecho puede deberse a varias razones:

- Es necesario tener en cuenta que las determinaciones en bibliografía se realizan directamente a partir de muestras de suero y en nuestro centro se emplean las determinaciones en plasma, que poseen dilución con anticoagulante (por cada 60 ml de plasma aproximadamente 20 ml de la solución anticoagulante). Haciendo cálculos aproximados esto supondría:
  - En el caso concreto del EGF, pasa de una media de 0,13 a 0,20 ng/ml para EGF. Versura (175,187) presenta un rango de valores de EGF entre 0,2-3 ng/ml. Nuestra media de EGF se encontraría, por tanto, en el límite inferior.
  - Con respecto al TGF, haciendo la conversión de plasma a suero se pasaría de 3,04 a 4,56 ng/ml. En este caso, la concentración es claramente inferior a los valores publicados por otros autores (175), 30-51 ng/ml.
- El tiempo entre la recogida de la muestra y el procesamiento del cordón para elaborar los colirios podría influir en los resultados. Liu (188) afirma que el tiempo de coagulación puede influir aumentando los niveles de EGF y disminuyendo los valores de TGF, pero sólo estudia el efecto hasta 120 minutos de reposo. En nuestro estudio el tiempo



máximo establecido entre la extracción y procesamiento es 24 horas, mientras que otros autores (174,175) preparan el colirio de SCU de manera similar al SA, centrifugando la muestra de sangre tras dejarla dos horas a temperatura ambiente. Si el TGF disminuye en función del tiempo previo a la preparación del suero, podría ser una explicación de los bajos niveles obtenidos en nuestras muestras de SCU.

## 5.7. Particularidades del procesamiento del SCU en nuestro centro

### 5.7.1. Tiempo de procesamiento

La razón por la cual las muestras de SCU de este estudio tardaron más en procesarse que las de SA es que en nuestro centro primero se evaluaba la idoneidad de la muestra de sangre de cordón umbilical para ser empleada como trasplante de progenitores hematopoyéticos. En caso de que se descartase para este fin, la muestra de sangre de cordón umbilical se destinaba al presente estudio. En todos los casos se emplearon unidades con menos de 24 horas desde la extracción a la separación.

Quizá por el tiempo transcurrido mientras se realizaba dicha valoración, las concentraciones de las diversas moléculas en el SCU descendían, como hipotiza Liu (188) para el TGF y por tanto no son comparables a las publicadas por otros autores (28,173-175,187), que procesaban con relativa inmediatez (dos horas) la muestra para obtener el colirio de SCU. Sin embargo, es posible congelar las muestras de SCU a - 80°C durante seis meses sin que descendan el EGF y el TGF (175).

Por nuestra parte, pretendemos realizar estudios de estabilidad de las moléculas en el SCU según el tiempo transcurrido entre la extracción de sangre y la preparación del colirio para confirmar esta hipótesis.

### 5.7.2. Rentabilidad del colirio de SCU

La preparación del colirio de SCU ha sido complicada: Se procesaron 34

donaciones de SCU, de las cuales sólo 17 (50%) resultaron válidas, ya que las otras 17 (50%) muestras presentaron un severo grado de hemólisis tras la centrifugación. De estas 17 donaciones aptas, sólo se pudieron emplear las muestras de 14 donantes, ya que otras tres (17,6%) fueron positivas a control de bacteriología.

Sin embargo, el colirio de SCU presenta una gran rentabilidad en nuestras manos: con una sola donación, se han obtenido de media 15 viales. En total, de las 14 donaciones viables, se obtuvieron 211 viales de colirio de SCU.

La principal ventaja del SCU comparada con otros sueros heterólogos es que no es necesario emplear sangre de banco para elaborarlo, que es escasa, puede destinarse a múltiples fines y además debe ser del exclusivamente del tipo AB para evitar antigenicidad. Para la preparación del colirio SCU siempre puede emplearse la sangre de las donaciones de sangre de cordón umbilical no aptas para realizar un trasplante de progenitores hematopoyéticos. Por otro lado, la sangre de cordón umbilical no posee aglutininas, y por lo tanto no es antigénica.

## 5.8. Limitaciones del estudio

### 5.8.1. Cálculo del número muestral

Ha sido extremadamente complicado realizar un cálculo del número muestral para este ensayo clínico. Las principales dificultades para el cálculo del número muestras derivaron de que este es el primer ensayo clínico que compara el efecto de los tres sueros (SA, SH, SCU) entre sí de manera aleatorizada, por lo que ha sido necesario recurrir a cálculos estadísticos muy complejos (ver apartado “Material métodos”).

### 5.8.2. Reclutamiento de pacientes

Es importante señalar la enorme dificultad enfrentada en el reclutamiento de pacientes en el presente estudio. Desde diciembre de 2012 hasta mayo de 2015 se han evaluado casi 500 pacientes derivados por oftalmólogos por presentar quejas de ojo seco que no respondían a tratamiento habitual. Finalmente se incluyeron en el estudio 96 ojos de 48 pacientes: tres grupos de 32 ojos de 16 pacientes tratados con SCU, SA y SH, respectivamente. Para el presente trabajo sólo se emplean los datos

referidos al SA y al SCU. El número total de pacientes del ensayo clínico es similar al publicado por Yoon (174), que comparó 92 ojos de 48 pacientes con SOS moderado-severo. Sin embargo, es posible que con un mayor número de pacientes incluidos se hubieran podido detectar diferencias entre SA y SCU.

Muy pocos pacientes de nuestro medio presentan los criterios de inclusión necesarios para participar en este ensayo, con excepción de los pacientes con enfermedades autoinmunes. De entre los pacientes que cumplían los criterios, un porcentaje desestimaba la participación debido a su rechazo a emplear suero procedente de otros sujetos (heterólogo, sangre de banco / donantes de cordón), mientras que otros manifestaban imposibilidad logística para efectuar las visitas periódicas necesarias para la extracción sanguínea y las revisiones oftalmológicas.

Con respecto a los abandonos, 14 ojos de 7 pacientes firmaron el consentimiento y comenzaron el estudio, pero lo abandonaron tras la primera visita oftalmológica y no llegaron a extraerse la sangre. Es preciso señalar que todos los pacientes que se extrajeron sangre y comenzaron con el tratamiento tópico con hemoderivados completaron el estudio. Ningún paciente abandonó el ensayo entre la segunda y tercera visita.

### 5.8.3. Ausencia de grupo control

No hemos considerado la inclusión de un grupo control de individuos sanos en este estudio desde el punto de vista ético debido a la improbable, aunque posible, transmisión de enfermedades infecto-contagiosas vía la instilación de los sueros. Asimismo, el requerimiento de la extracción periódica de sangre durante tres meses constituía un inconveniente al que no deseábamos someter a los posibles individuos del grupo control.

### 5.8.4. Sesgos

#### 5.8.4.A. Sesgo de selección.

- a) Autoselección.

La decisión final de participar en el ensayo clínico recae en el paciente.

- b) Pérdida.

La falta de seguimiento de pacientes durante el estudio puede estar causada por ciertas características intrínsecas a la efectividad del tratamiento o sus efectos adversos.

#### 5.8.4.B. Sesgo de medida.

Por todo lo comentado en el apartado 5.3.1., “Cálculo del número muestral”, la exploración mediante pruebas objetivas del ojo seco presenta una cierta variabilidad intra e interobservador, al tratarse de pruebas no automatizadas y que pueden variar según las condiciones ambientales, con lo que puede incurrirse en un déficit de concordancia.

#### 5.8.4.C. Sesgo de participación en ensayos clínicos (efecto Hawthorne).

Supone la alteración en la actitud del paciente incluido en un ensayo clínico al saber que está siendo estudiado.

### 5.8.5. Test empleados

Para el presente trabajo hemos seleccionado como tests oftalmológicos objetivos el test de Schirmer, el BUT, la tinción con fluoresceína y la tinción con verde de lisamina, que son pruebas ampliamente contrastadas, validadas y empleadas en multitud de estudios. Asimismo, practicamos una citología de impresión a todos los pacientes en cada una de las visitas, pero por problemas logísticos y de conservación de las muestras, no se han podido analizar correctamente.

Por no disponer en nuestro centro de pruebas como la osmometría lagrimal, la meibomiografía, la meniscografía, la medición del aclaramiento lagrimal, la estesiometría, la termografía, la microscopía confocal y la estimación objetiva del tiempo de parpadeo, no ha sido posible efectuarlas. Podría haber sido interesante haber realizado pruebas topográficas de la morfología corneal y la determinación de los componentes lagrimales. Sin embargo, es necesario recalcar que varios autores (189-191) y el propio Subcomité para el diseño de ensayos clínicos acerca de ojo seco del Taller Internacional de Ojo Seco (24) señalan que ninguna variable para ser tomada como variable principal y que no existe ninguna técnica que constituya por sí misma un *Gold Standard* para el diagnóstico de SOS (24).

## 5. Discussion

### 5.1. Demographic data

*In the present study 64 eyes of 32 caucasian patients with moderate to severe dry eye syndrome (DES) where recruited and randomized. The scope of the present work is to assess the effect of autologous serum eye drops (AS) versus umbilical cord blood serum (UCBS) eye drops at one and three months, measuring the following ocular surface test: Schirmer test, BUT, fluorescein staining, lissamine green staining and a questionnaire (104).*

*Yoon (174) compared 92 eyes of 48 patients with moderate to severe DES. 41 eyes of 21 patients were assigned to the AS Group and 51 eyes of 27 patients to the UCBS group. Schirmer test, BUT, fluorescein staining, tear clearance, corneal esthesiometry and a questionnaire where performed, at one and two months after the beginning of the treatment.*

*Versura (175) applied UCBS in 59 eyes 30 patients, 33 with GVHD and 26 with Sjögren syndrome with a grade 4 or more in the Oxford scale. Schirmer test, BUT, fluorescein staining, corneal esthesiometry and symptoms, satisfaction and tolerability tests were performed before and one month after starting the treatment.*

*Most of the patients of our study were females: 56 patients (86%), with a feminine/masculine ratio for the AS group of 32:0, and a 24:8 (3:1) ratio for the UCBS group. The mean age of the patients of the present study was 61.5 years (range 44 - 88). The mean age in the AS group was 56 years (range 45.9 - 64) and 62 years (range 57.75 – 69.25) in the UCBS group. This difference was statistically significant ( $p = 0,010$ ).*

*Yoon (174) provides a more homogeneous group, with a feminine/masculine ratio of 11:10 for the AS group and a 15:12 ratio for the SCU Group. Besides, the population in his work is also younger, the mean age was 39.95 years (range 20 - 59) and 41.96 years (range 20 – 61) in the AS group and in the UCBS group, respectively.*

*Versura (174) reported 59 eyes, 19 were female patients and 11 man patients. The Sjögren syndrome group was constituted only by female patients with a mean age of  $59.6 \pm 13.1$  years. El GVHD group had a higher proportion of male patients (11 versus 6 female patients) and lower mean age:  $38.8 \pm 5.8$  years.*

*DES affects mainly post-menopausal woman, elderly patients and patients with autoimmune diseases (66-71). While the subgroup with auto-immune diseases of Versura (175) and the patients of our study coherent with the described epidemiology of DES, The demographic sample of Yoon's article (174) is not (66-71), even when considering the Korean population, where he performed the study (181).*

## *5.2. Response to the treatment*

*When analysing the clinical response to AS and UCBS eye drops, measured by the changes in Schirmer test (mm), BUT (seconds), fluorescein staining of the ocular surface (according to Oxford scale), lissamine green staining of the corneo-conjunctival epithelium (according to the van Bijsterveld scale) and the questionnaire of Donate (104), we found statistically significant changes in all the tests. Thus, both treatments significantly improved the condition of the ocular surface after three months of treatment.*

*The effects of AS eye drops for DES are well-known. Almost all authors have found a subjective improvement of the ocular surface as soon as 48 after starting the treatment (23,165,166): Tsubota (158) and Poon (162) described an improvement in the fluorescein staining (165) and Schirmer test. Other authors did not find changes in the Schirmer test with the AS (5,23,158). Kojima (164) reported an improvement in the BUT of patients treated with AS compared to conventional artificial tears.*

*Yoon (174) and Versura (175) have reported the outcomes of UCBS eye drops treatment for DES. Yoon (174) found an improvement in the questionnaire, BUT and fluorescein staining, both with AS and UCBS eye drops after one and two months of treatment. Versura (175) reported positive changes in Schirmer test, BUT, osmolarity, squamous metaplasia and questionnaire as soon as one month after the treatment.*

### 5.3. Comparison between AS and UCBS eye drops

*The results from the present study show that UCBS eye drops are not inferior to AS eye drops for the treatment of DES:*

- When comparing the outcomes of both treatments for the Schirmer test, BUT and fluorescein staining, no statistically significant differences were found.*
- Statistically significant differences were found in the lissamine green staining, which showed slightly better results in the SA group. However, given that the values were already better in the first appointment (previous to treatment), it does not seem like a relevant outcome.*
- When comparing the results from the third follow-up to the first one for all the tests performed, including the questionnaire, there were no statistically significant differences between both treatments.*

*Yoon (174) reported that eyes treated with both AS and UCBS eye drops showed improvement in symptoms, BUT, corneal staining and cytology (in AS, only in patients without Sjögren syndrome). UCBS eye drops were more effective than AS in the punctuation of questionnaire, corneo-epitheliopathy healing and the density of conjunctival goblet cells. Shen (182) showed that UCBS was superior to AS regarding epithelial cells proliferation and differentiation.*

### 5.4. Patients with previous treatment

*There were 12 eyes (38%) in the AS group and 8 eyes (25%) in the UCBS group that used previous treatment with AS and fulfilled the inclusion criteria of our study, all of them women with autoimmune disease. After a washout period of four weeks using artificial tears and ointments, they were enrolled in the study.*

*There were not statistically significant differences between the patients that have previously used treatment with AS and were assigned to the AS group and those assigned to the UCBS treatment. Surprisingly, the only statistically significant value ( $p = 0.046$ ) was the scoring of the questionnaire in the third appointment, which was inferior (thus, better) in those patients assigned to the AS*



group that previously used AS. This maybe caused by the Hawthorne effect, also known as the observer effect.

### 5.5. Patients with autoimmune disease

In our study 67% of the patients showed previous autoimmune disease, 86% of them were female patients. These figures are coherent with the works published by other authors (67), that also find that patients with autoimmune diseases show more often signs and symptoms of DES, and are generally female patients (78%). The most prevalent illnesses in our study where primary Sjögren syndrome (18 eyes, 9 patients) and rheumatoid arthritis (18 eyes, 9 patients). Yoon (174), however, reported a 37% of patients with Sjögren syndrome (the only autoimmune disease he included in his study), of which 77% were women.

DES in Sjögren syndrome is often severe and refractory to treatment because the lagrimal secretion is greatly impaired (167). Tsubota (158) argues that AS is the preferred therapy in these patients, due to the similar biochemical characteristics of AS compared to the tear fluid, for being hypoallergenic and for containing growth factors and other necessary molecules for the ocular surface homeostasis. Noble (23) and Kojima (157) in their prospective and randomized studies treating Sjögren syndrome patients with AS, only found improvement in the conjunctival cytology and symptom scoring.

Before starting this study, we had a concern about using AS in patients with autoimmune diseases, given that the concentration of growing factors is lower in the serum of these patients (174,175,183-186). Nonetheless, the statistical analysis performed in the present work did not show differences between patients with autoimmune diseases assigned to SA group and those that were treated with UCBS eye drops. The only statistically significant value was the difference in the age of patients ( $p = 0.003$ ).

On the other hand, Yoon (174), found that UCBS eye drops were more effective than AS eye drops in the treatment of Sjögren syndrome, regarding symptom scoring, corneal staining and conjunctival cytology. Versura (175) included graf-versus-host-disease and Sjögren syndrome patients with severe persistent corneal defects. After one month of treatment with UCBS, BUT, Schirmer



*test, tear osmolarity, corneal esthesiometry, conjunctival epithelial metaplasia and the scoring of the questionnaire improved significantly.*

## **5.6. Concentration of molecules**

*There was a significant difference in the values of all the molecules in favor of the AS: albumin (g/dl), fibronectine ( $\mu\text{g/ml}$ ), IgA (mg/dl), IgG (mg/dl), IgM (mg/dl), vitamine A ( $\mu\text{g/dl}$ ), vitamine E ( $\mu\text{g/dl}$ ), EGF (ng/dl) and TGF (ng/dl).*

*However, the previous work in which the present study was based (174) and posterior articles (175,187,188), reported that the concentration of growth factors is higher in UCBS than in peripheral blood serum (AS in our study), except for vitamine A.*

*Specifically, Yoon and Versura (28,173-175,187) found:*

*a) Concentration of molecules that were higher in UCBS than AS:*

- EFG and TGF $\beta$ , three times and twice higher, respectively.*
- Other growth factors not included in this study: NGF y VEGF.*
- P substance.*

*b) Concentration of molecules that were lower in UCBS than AS:*

- IGF (not included in this study).*
- Vitamine A. Even with the lower concentration in UCBS than AS, it was still higher than the concentration in tears and enough to prevent squamous metaplasia.*

*The Centro Regional de Transfusión Sanguínea of Málaga owns the bigger Cord Blood Bank in Europe in terms of stored units. We do not believe that there were mistakes in the technique of preparation of the serum eye drops, because in the AS eye drops we obtain similar values to those reported by other authors (157,161,174,175,187).*

*When comparing the mean values of the molecules of the AS eye drops samples with those reported by Geerling (157), they were equivalent, except for the vitamine A, whose concentrations were higher in our samples (table 7).*

	<i>Our study</i>	<i>Geerling (157)</i>
<b>EGF (ng/ml)</b>	0.81	0.5
<b>TGF-<math>\beta</math> (ng/ml)</b>	21.10 ( $\pm$ 5.66)	6-33
<b>Vitamina A (mg/ml)</b>	42.60 ( $\pm$ 15,37)	46
<b>IgA (mg/dl)</b>	344.46 ( $\pm$ 232.92)	2
<b>Fibronectina (<math>\mu</math>g/ml)</b>	255 ( $\pm$ 185.30)	205

Table 7. Comparison of the values of various molecules in the AS eye drops of our samples and Geerling's (157).

Unexpectedly, the concentrations of the molecules in the UCBS eye drops samples were inferior to those in AS, in contradiction to the results published by other authors (28,173-175,187), except for the vitamine A which was reported to be lower in UCBS. This fact may be caused by various reasons:

- *It is important to take into account that the determinations reported in the articles mentioned, are calculated directly in serum samples. We have used the determinations in plasm, that is diluted in anticoagulant (20 ml of anticoagulant solution for every 60 ml of plasm, approximately). Performing the calculations the following concentrations would result:*
  - *For the EGF, it would pass from an average of 0.13 ng/dl in our calculations in plasm to 0.20 ng/ml converted to the serum concentration. Versura (175,184) reports a range of 0.2-3 ng/ml, thus, our average concentration would fall in the inferior range of concentration.*
  - *For the TGF, even making the conversion from plasm (3.04 ng/ml) to serum (4.56 ng/ml) concentrations, the values are clearly lower to those reported by other authors (175), 30-51 ng/ml.*
- *The time ellapsed between obtaining the cord blood sample and processing it to prepare the UCBS, could have influenced the concentration of TGF. Liu (188) reports that coagulation time can augment the concentration of EGF and diminish the levels of TGF,*

*although he only studied the effect up to 120 minutes. In our study the maximum time elapsed between the extraction of the umbilical cord blood and its processing is 24 hours. Other authors (174,175) prepare the UCBS eye drops in a similar fashion to AS eye drops, centrifuging the sample after two hours of storing it at room temperature. If TGF diminishes constantly until the blood is processed, that could be an explanation for the low concentrations in the UCBS eye drops we obtained.*

## *5.7. Particularities of the UCBS processing in our centre*

### *5.7.1. Processing of the UCBS samples*

*The UCBS eye drops for the present study were prepared from those samples that were no valid for the transplant of hemopoietic progenitors. In all cases, the time elapsed between the blood extraction and the preparation of the eye drops was less than 24 hours, but this period is certainly higher than the time reported by other authors (174,184).*

*This larger amount of time between extraction of the umbilical cord blood and preparation of UCBS eye drops may have caused the decrease in molecules in UCBS eye drops we found in our study compared to other authors (28,173-175,187). The work of Liu (188) seems to support this hypothesis. However, it is possible to freeze the samples of UCBS up to - 80°C during six months and preserve the concentration of EGF and TGF (175).*

*To assess this issue we intend to perform a study regarding the stability of the molecules in the UCBS eye drops depending on the time elapsed between extraction of the umbilical cord blood and preparation of the eye drops, i.e., if shorter periods of time between extraction and preparation yield higher proportions of molecules in the UCBS eye drops.*

### *5.7.2. Effectiveness of the UCBS eye drops*

*The procedure of obtaining the UCBS eye drops was complicated. From the 34 umbilical cord blood samples there was a 50% (17 samples) of severe hemolysis after centrifugation. From the remaining 17 valid samples only 13 could be finally used, because three samples (17.6%) showed bacterial contamination.*

*However, the UCBS eye drops procedure showed a good effectiveness: from a single donation, an average of 15 vials were obtained. In total, from the 14 valid donations, 211 vials of UCBS eye drops were obtained.*

*The main advantage of UCBS eye drops compared to other heterologous eye drops is that for preparing the UCBS eye drops the discarded blood from samples that are no valid for the transplant of hemopoietic progenitors are used. Besides, UCBS does not contain agglutinins, and thus is not antigenic. However, for preparing a regular heterologous serum eye drops, the blood comes from the regular donations, and must be always from the AB group to avoid antigenicity. Blood nowadays is scarce and can be used in other multiple procedures and interventions.*

## **5.8. Limitations of the study**

### **5.8.1. Sample size calculation**

*We would like to emphasize the difficulty of recruiting the necessary number of patients for the current study. From December, 2012 to May, 2015, almost 500 patients have been evaluated, all of them referred by ophthalmologists because of dry eye symptoms that did not improved with convencional therapy. Finally, 96 eyes of 48 patients were included in the clinical trial: three groups of 32 eyes of 16 patients treated treated with AS, UCBS and heterologous serum (HS). For the present work, only the data of the AS and UCBS groups were included. The total sample size of the clinical trial, including HS, was similar to that reported by Yoon (174), that included 92 eyes of 48 patients with moderate to severe DES. However, a higher number of patients included could have shown differences between AS and UCBS.*

### 5.8.2. Patient enrollment

*A very low rate of the studied patients fulfilled the inclusion criteria for the study, except for the patients with autoimmune diseases. Among the patients that met the criteria, a percentage neglected to participate because of the rejection to use serum from other donors (heterologous / umbilical cord blood), while others manifested their impossibility to attend the periodical appointments for blood extraction and ophthalmologic follow-ups.*

*Regarding the patients that abandoned the study, 14 eyes of 7 patients signed the informed consent and underwent the first ophthalmologic follow-up, but did not complete it. Though, all patients that had the blood extraction performed, completed the study. No patient abandoned the trial between the second and third ophthalmologic follow-up.*

### 5.8.3. Control group absence

*We have not considered to include a control group in our study because from the ethical point of view there is a minimal, but possible chance of acquiring an infectious disease with the heterologous eye drops. Besides, the control group should have undergone periodical blood extractions during the three months of the study, fact that we find most inconvenient.*

### 5.8.4. Biases

#### 5.8.4.A. Bias of selection.

##### a) Auto-selection.

*The decision to participate in the clinical trial is voluntary, up to the patient.*

##### b) Lost follow-ups.

*Patients that voluntarily abandon the study may show some adverse effects related to the treatment that can not be assessed.*

#### 5.8.4.B. Bias of measurement.

*The regular, non-automated, available tests to explore the DES show a certain*

*intrinsic intra and inter observer variability that may affect the precision of the measurements.*

#### *5.8.4.C. The observer effect bias (Hawthorne effect).*

*The patients included in a clinical trial tend to modify or improve their compliance and behavior in response to their awareness of being observed.*

#### *5.8.5. Performed tests*

*For the present work we have chosen as ophthalmologic tests: Schirmer test, BUT, fluorescein staining, lissamine green staining and a questionnaire. These tests are widely accepted, regularly included in clinical studies and performed by ophthalmologists worldwide. We also performed a conjunctival impression cytology of every patient in all the visits, but unfortunately due to logistic reasons and problems with the storage of the samples, most of them were damaged and could not be analyzed.*

*Unfortunately, more advanced techniques and devices as an osmometer, meibometry, meniscography, rate of tear clearance, esthesiometry, termography, confocal microscopy and the objective assessment of the blinking time are not available in our centre. On the other hand, it could have been interesting to perform a corneal topography and to analyse the concentration of the molecules in the tear fluid.*

*However, various authors (189-191) and specially the Report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye Workshops (2007), both in “Methodologies to Diagnose and Monitor Dry Eye Disease” and in “Design and Conduct of Clinical Trials” sections, emphasize that no test can be chosen as a Gold Standard for the DES diagnosis and no variable may be taken as definitive (24).*

## Conclusiones y *conclusions*

## 6. Conclusiones

Del análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se extrajeron las siguientes conclusiones:

1. Ambos sueros son efectivos para el tratamiento del ojo seco.

El test de Schirmer, el BUT, la tinción con fluoresceína, la tinción con verde de lisamina y el cuestionario mejoraron a lo largo de los tres meses del estudio con ambos tratamientos.

2. El SCU no es inferior al SA en el tratamiento del ojo seco.

No ha habido diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos en el test de Schirmer, BUT, tinción con fluoresceína y el cuestionario, al mes y los tres meses de comenzar el tratamiento. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la tinción con verde de lisamina a favor del SA.

3. El SCU no presenta una mayor concentración de moléculas que el SA.

En el presente estudio se ha hallado una menor concentración de albúmina, fibronectina, IgA, IgG, IgA, vitamina A, vitamina E, EGF y TGF en el SCU comparado con el SA. Este hecho puede ser debido a que el tiempo de almacenamiento previo a la preparación del colirio de SCU fue mucho mayor que el del SA.

4. El SCU presenta algunas ventajas con respecto al SA.

- Pueden prepararse varios viales de una sola donante (15 viales de media por donación).



- Puede almacenarse de manera segura, por lo que puede administrarse inmediatamente en pacientes con patología urgente de la superficie ocular.
  - No es necesaria la extracción sanguínea al paciente, sino que se aprovechan las donaciones de sangre de cordón umbilical descartadas para trasplante de progenitores hematopoyéticos. Por tanto, es una opción terapéutica en pacientes no candidatos a la extracción periódica de sangre.
5. Más estudios prospectivos, aleatorizados y con número muestral amplio son necesarios para comparar los efectos entre los distintos sueros, con el objetivo de elaborar recomendaciones específicas para su empleo en los diversos contextos clínicos.

## 6. Conclusions

*After analyzing the data of the present study, we have arrived to the following conclusions:*

1. *Both AS and UCBS eye drops are effective for the treatment of the dry eye.*

*Schirmer test, BUT, fluorescein staining, lissamine green staining and questionnaire scores improved during the three months of the study both with AS and UCBS eye drops.*

2. *UCBS is not inferior to AS in the treatment of the dry eye.*

*There have not been statistically significant differences between AS and UCBS for the Schirmer test, BUT, fluorescein staining and the questionnaire scores at one and three months after starting the treatment. There has been, however, a statistically significant difference in the lissamine green staining in favour of SA.*

3. *UCBS do not contain a higher concentration of molecules compared to AS.*

*In the current study we have been found a lower concentration of albumin, fibronectine, IgA, IgG, IgA, vitamine A, vitamine E, EGF and TGF in the UCBS eye drops compared to the AS eye drops. This may have been caused because of the longer storage time before the preparation of the UCBS eye drops compared to the AS eye drops.*

4. *UCBS eye drops show some advantages compared to AS eye drops.*

- *Various vials can be obtained from a single donor (15 on average).*

- *It can be prepared and stored safely in advance, so it can be administered immediately in case of an urgent condition of the ocular surface.*
  - *It is not necessary to perform the blood extraction to the patient. The eye drops are prepared from those samples that are no valid for the transplant of hemopoietic progenitors. Thus, UCS eye drops are an excellent option in those patients not suitable for periodic blood extraction.*
5. *The outcomes of the present study warrant further exploration in a larger, prospective, aleatorized study in order to compare the effects of the different serum eye drops, with the aim of developing specific recommendations for the diverse clinical scenarios.*

# Abreviaturas

## 7. Abreviaturas

SOS =	síndrome de ojo seco
SA =	colirio de suero autólogo
SH =	colirio de suero heterólogo
SCU =	colirio de suero de sangre de cordón umbilical
UFL =	unidad funcional lagrimal
OSAD =	ojo seco acuo-deficiente
OSE =	ojo seco evaporativo
BUT =	break up time, tiempo de rotura lagrimal
EICH =	enfermedad injerto contra huésped.

# Bibliografía

## 8. Bibliografía

1. Gayton LG. Etiology, prevalence, and treatment of dry eye disease. *Clin Ophthalmol*. 2009; 3: 405–1 412.
2. (Miljanovic B, Dana R, Sullivan DA, Schaumberg DA. Impact of dry eye syndrome on vision-related quality of life. *Am J Ophthalmol* 2007; 143: 409-15.
3. Pflugfelder 1994Prevalence, Burden, and Pharmacoeconomics of Dry Eye Disease. 1994
4. Fox RI, Chan R, Michelson JB, Belmont JB, Michelson PE. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 459-461.
5. Tsubota K, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. "Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application". *Ophthalmology* 1999; 106: 1984-1989.
6. Nelson JD, Gordon JF, 1992; Bosch-Valero J, Martin-Avia J, Sierra-Barreras J, Rodríguez-Marco A, Cristobal-Bescos JA. Suero autólogo en patología ocular por hipovitaminosis. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2008;83:45–8.
7. Bosch-Valero J. 2008. Bosch-Valero J, Martin-Avia J, Sierra-Barreras J, Rodríguez-Marco A, Cristobal-Bescos JA. Suero autólogo en patología ocular por hipovitaminosis. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2008;83:45–8.
8. Yoshino K, 1996. Yoshino K, Garg R, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC. Production and secretion of transforming growth factor beta (TGF-beta) by the human lacrimal gland. *Curr Eye Res*.1996;15:615–24.
9. López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Martínez-Garchitorena J. Aplicaciones del suero autólogo en Oftalmología. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2007; 82:9-20.
10. Goulart Quinto G, Campos M, Behrens A. Autologous serum for ocular surface diseases. *Arq Bras Oftalmol*. 2008;71(6supl):47-54.
11. Murube del Castillo J. Prólogo. En: López García JS, Murube del Castillo J. Suero autólogo y derivados hemáticos en oftalmología. Comunicación solicitada. 87 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. 2011.
12. Young AL, Cheng Ac, Ng HK, Cheng LL, Leung GY, Lam DS. The use of autologous serum tears in persistent corneal epithelial defects. *Eye* 2004;18:609-614
13. Benítez del Castillo JM, De la Casa JM, Sardina RC, Fernández RM, Feijoo JG, Gómez AC, et al. Treatment of recurrent corneal erosions using autologous serum. *Cornea* 2002;21:781-783
14. Nikolaos G, Ziakas MD, Konstaninos G et al. Long-term follow up of autologous serum treatment for recurrent corneal erosions. *Clinical and experimental Ophthalmology* 2010;38:683-687.
15. Ziakas NG, Boboridis KG, Terzidou C, Naoumidi TL, Micropoulos D, Georgiadou EN, Georgiadis NS. Long-term follow up of autologous serum treatment for recurrent corneal erosions. *Clin Experiment Ophthalmol* 2010 Oct;38(7):683-7. doi: 10.1111/j.1442-9071.2010.02304.x. Epub 2010 Jul 9.
16. Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Ohashi Y, Kojima T, Ishida R, Tsubota K. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology* 2004;111:115-1120
17. Ogawa Y, Okamoto S, Mori T, Yamada M, Mashima Y, Watanabe R, et al. Autologous serum eye drops. For the treatment of severe dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:579-583
18. López-García JS, Rivas L, García-Lozano I, Murube J. Autologous serum eyedrops in the treatment of aniridic keratopathy. *Ophthalmology* 2008 Feb;115(2):262-7. Epub 2007 Aug6.



19. Goto E, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum. *Cornea* 2001;20:807-810
20. Christmas NJ, Skolik SA, Howard MA, Saito Y, Barnstable CJ, Liggett PE. Treatment of retinal breaks with autologous serum in an experimental model. *Ophthalmology* 1995;102:263-271
21. Liggett PE, Skolik DS, Horio B, Saito Y, Alfaro V, Mieler W. Human autologous serum for the treatment of full-thickness macular holes. A preliminary study. *Ophthalmology* 1995;102:1071-1076
22. Nakamura H, Hayakawa K, Sawaguchi S, Gaja T. Removal of retinal indocyanine green dye by autologous serum irrigation in macular hole surgery. *Retina* 2005;25:736-741
23. Noble et al. Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in randomized controlled crossover trial for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 2004; 88: 647-42.
24. International Dry Eye Workshop (DEWS). Report of the Management and Therapy Subcommittee of the International Dry Eye Workshop. *Ocular Surface* 2007; 5(2):163-178
25. Hdez Lamas MC; Guijarro Hdez, L; Galeote Padilla, A; Martín Bejar, M; Mayorga Pastrana, C; Falcón Morales F; Jaen García, J; Ponce Verdugo, L; Prat Arrojo, I. Colirio heterólogo como alternativa a pacientes con indicación de colirio autólogo. SETS. 2011.
26. Congreso Internacional de Banco de Tejidos (Guijarro L, 2011). Guijarro Hdez, L. Benítez del Castillo, J. Ponce Verdugo, L. Gómez Maldonado, P. Hernández Lamas, MC, Prat Arrojo, I. Assessment of subjective parameters of patients with autologous vs heterologous eye drops treatment in ocular pathology. AEBT. 2011
27. Yoon KC, Heo H, Jeong IY, Park YG. Therapeutic effect of umbilical cord serum eye drops for persistent epithelial defect. *Korean J Ophthalmol* 2005;19:174 –178.
28. Yoon KC, Im SK, Park YG, Jung YD, Yang SY, Choi J. Application of umbilical cord serum eye drops for the treatment of dry eye syndrome. *Cornea* 2006;25:268 –272.
29. Yoon KC, Jeong IY, Im SK, Park YG, Kim HJ, Choi J. Therapeutic effect of umbilical cord serum eye drops for the treatment of dry eye associated with graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2007;39:231–235.
30. Murube J. Técnicas quirúrgicas en el tratamiento del ojo seco. Barcelona: Glosa, 2007;9-12.
31. López García JS, Murube del Castillo J. Prólogo. Suero autólogo y derivados hemáticos en oftalmología. Comunicación Solicitada. 87 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología, 2011.
32. Güemez-Sandoval E, El papiro de Ebers y la Oftalmología. *Rev Mex Oft.* 2009; 83(2):123-125
33. Murube J. Concepto de ojo seco. En Murube et al. 72 Ponencia de la Sociedad Española de Oftalmología. Granada, 1997.
34. Viso Outeiriño, E. Prevalencia del ojo seco en el área sanitaria de O Salnés (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela; 2008.
35. Murube J. Dacriología Básica. Las Palmas: Royper, 1982; 449-780
36. Lemp. Lemp MA, Dohlman CH, Kuwabara T, Holly FJ, Carroll JM. Dry eye secondary to mucous deficiency. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1971; 75: 1223-7
37. Tiffany JM. The role of the meibomian secretion in tears film. *Trans Ophthalmol Soc UK.* 1985; 104: 396-401)
38. Murube J, Benítez del Castillo JM, Chenzhuo L, Berta A, Rolando M. Triple clasificación de Madrid para el ojo seco. *Arch Soc Esp Oftalmol* [revista en la Internet]. 2003 Nov [citado 2012 Mayo 21]; 78(11): 595-602.
39. Thoft RA, Fiend J. Biochemical transformation of regenerating ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16: 14-20
40. Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, Gao J, Mircheff AK, Pflugfelder SC. The pathology of Dry Eye: The interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* 1998; 17: 584-9)



41. Alió JL, Pastor S, Ruiz-Colecha J, et al. Treatment of ocular surface syndrome after LASIK with autologous platelet-rich plasma. *J Refract Surg* 2007; 23:617-9.
42. Alió JL, Ruiz-Colecha J, Pastor S, et al. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res* 2007;39:124-9.
43. Alió JL, Abad N, Artola A, et al. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. *Ophthalmology* 2007;114:1286-93.
44. Alvarado Valero MC, Martínez Toldos JJ, Borrás Blasco J, et al. Tratamiento de los defectos epiteliales persistentes mediante suero autólogo. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2004;79:537-42.
45. Díaz Llopis M, Udaondo P, Salom D, et al. Intravitreal autologous plasmin without associated vitrectomy. Pharmacological vitreolysis, a perfectionated method using urokinase. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2008;83:291-2.
46. García Gómez S, García Delpech S. El colirio de autosuero en el tratamiento de las causticaciones corneales. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1989;57:403-8.
47. López-Plandolit S, Morales C, Freire V, Durán. Plasma Rich in growth factors as a therapeutic agent for persistent corneal epithelial defects. *Cornea* 2010;29:843-8.
48. International Dry Eye Workshop (DEWS) The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop. *Ocul Surface*. 2007;5:75-92.
49. Tseng SC, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol*. 1997; 124: 825-835.
50. Arntz Bustos A, Durán de la Colina JA. Anatomía funcional de la superficie ocular. En: *Superficie ocular. LXXX Ponencia de la Sociedad Española de Oftalmología*. 2004.
51. Fisiología normal de la superficie ocular. En: *Enfermedades externas y córnea*. Madrid: Elsevier; 2007. p. 53-9.
52. Anatomía. En: Arffa RC, Grayson. *Enfermedades de la córnea*. 4ª Ed. Madrid: Mosby; 1999. p. 1-22.
53. Dua et al. Human Corneal Anatomy Redefined A Novel Pre-Descemet's Layer (Dua's Layer) *Ophthalmology* 2013;120:1778-1785.
54. Re: Dua et al.: Human Corneal Anatomy Redefined A Novel Pre-Descemet's Layer (Dua's Layer) *Ophthalmology* 2013;121:e24-e24.
55. Shaheen BS, Bakir M, Jain S. Corneal nerves in health and disease. *Survey Ophthalmol*. 2014;49:263-285.
56. Lemp MA, Beuerman RW. Tear film. En: *Cornea, Fundamentals, diagnosis and Management*. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. Krachmer. 2nd ed. New York: Elsevier; 2005. p. 33-40.
57. Murube J. Clasificación clínica del ojo seco. En: Murube J. *Ojo Seco-Dry Eye*. Madrid: Tecnimedia Edit; 1977. p. 39-44.
58. Prydal JJ, Artal P, Woon H et al. Study of human tear film thickness and structure using laser interferometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.1992;33:2006.
59. King-Smith PE, Fink BA, Fogt N, et al. The thickness of the human tear film: evidence from reflection spectra. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41:3348-3359.
60. Bron AJ et al. Rethinking Dry Eye Disease: A perspective on clinical implications. *The ocular surface*. 2014;12: S2, S1-S31.
61. Iglesias A. Perspectiva histórica. En Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Anaya JM, Coll J, Cervera R, Font J, Ingelmo M. *Síndrome de Sjögren*. Barcelona: Masson, 2003; 3-14.
62. Dilly PN. Structure and function of the tear film. *Adv Exp Med Biol* 1994; 350: 239-47
63. El ojo seco. En: Kanski JJ. *Oftalmología clínica*. 6ª Ed. Barcelona: Elsevier; 2009. 203-9.
64. Nassiri N, Djalilian AR, Hamrah P, Pflugfelder C. Dry eye. En: *Cornea, Fundamentals, diagnosis and Management*. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. Krachmer. 2nd ed. New York: Elsevier; 2005. p. 425-444.

65. Garg A. Fisiopatología de la película lagrimal. En: Garg, Sheppard, Donnenfeld, Meyer, mentha. Ojo seco y otros trastornos de la superficie ocular. Diagnóstico y tratamiento en Xerodacriología. Madrid. Ed. Panamericana; 2006. p. 1-29.
66. Moss SE, Klein R, Klein BE. Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome. *Arch Ophthalmol* 2000; 118: 1264-8.
67. Gayton JL. Etiology, prevalence, and treatment of dry eye disease. *Clinical Ophthalmology*. 2009;3; 405 - 412
68. Schaumberg DA, Sullivan DA, Buring JE, et al. Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am J Ophthalmol*. 2003;136:318–326.
69. McCarty CA, Bansal AK, Livingston PM, et al. The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia. *Ophthalmology*. 1998;105:1114–1119.
70. Lee AJ, Lee J, Saw S-M, et al. Prevalence and risk factors associated with dry eye symptoms: a population based study in Indonesia. *Br J Ophthalmol*. 2002;86:1347–1351.
71. Lin PY, Tsai SY, Cheng CY, et al. Prevalence of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: The Shihpai eye study. *Ophthalmology*. 2003;110:1096–1101.
72. Doughty MJ, Fonn D, Richeter D, et al. A patient questionnaire approach to estimating the prevalence of dry eye symptoms in patients presenting to optometric practices across Canada. *Optom Vis Sci*. 1997;74:624–631.
73. Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Results of a population-based questionnaire on the symptoms and lifestyles associated with dry eye. *Cornea*. 1999;18:408–411.
74. Murube J. Clasificación clínica del ojo seco. En: Murube J,. *Ojo Seco-Dry Eye*. Madrid: Tecimedia Editorial; 1997; 39-44.
75. Graves, R. Los mitos griegos. Madrid: Alianza Editorial; 1985.
76. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554-8.
77. Nelson JD, Shimakazi J, Benítez del Castillo JM, Craig JP, Den S, Foulks GN. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Definition and Classification Comitee. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011;30;52(4): 1930-37.
78. Nichols KK, Fuolks GN, Bron AJ, Glasgow BJ, Dogru M. Tsubota K, Lemp MA, Sullivan DA. The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Executive Summary. *Ivest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 30;52(4):1922-29.
79. Durán de la Colina JA. Lentes de contacto y superficie ocular. En: Superficie ocular. En: Superficie ocular. LXXX Ponencia de la Sociedad Española de Oftalmología. 2004. p. 87-96.
80. Lemp MA, Crews LA, Bron AJ, Foulks GN, Sullivan BD. Distribution of Aqueous-Deficient and Evaporative Dry Eye in a Clinic-Based Patient Cohort: A Retrospective Study. *Cornea*, 2012; 31: 472-478.
81. Baudouin C, Aragona P, Messmer EM, et al. Role of hyperosmolarity in the pathogenesis and management of dry eye disease: proceedings of the OCEAN group meeting. *Ocul Surf* 2013;11:246–58
82. Tsubota K, Fujita H, Tsuzaka K, Takeuchi T. Quantitative analysis of lacrimal gland function, apoptotic figures, Fas and fas ligand expression in lacrimal glands in dry eye patients. *Exp Eye Res* 2003; 76: 233-40.
83. Stern ME, Calonge M, Pflugfelder SC. Conceptos actuales en la fisiopatología del síndrome de ojo seco: papel de la unidad funcional lagrimal. En: Superficie ocular. LXXX Ponencia de la Sociedad Española de Oftalmología. 2004.
84. Pflugfelder SC, Jones D, ji Z, et al. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res* 1999; 19: 201-11.
85. Wei I, Asbell PA. The core mechanism of Dry eye is inflammation. *Eye Contact Lens*. 2014 July ; 40(4): 248–256

86. Hessen M, Akpek EK. Dry Eye: an Inflammatory Ocular Disease. *J Ophthalmic Vis Res* 2014; 9 (2): 240-250.
87. Stern ME, Gao J, Swchwalb TA, et al. Conjunctival T-cell subpopulations in Sjögren and non-Sjögren´s pacientes with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 2609-14.
88. Gao J, Swchwalb TA, Addeo JV, et al. The role of apoptosis in patogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical Cyclosporin A therapy. *Cornea* 1998; 17: 654-63.
89. Baudouin et el. Diagnosing the severity of dry eye: a clear and practical algorithm. *Br J Ophthalmol*. doi:10.1136/bjophthalmol-2013-304619.
90. Plugfelder et al. *Am J Manag Care*. 2008 Apr;14(3 Suppl):S102-6. Prevalence, burden, and pharmacoeconomics of dry eye disease
91. Friedman NJ. Impact of dry eye disease and treatment on quality of life. *Curr Opin Ophthalmol*. 2010 Jul;21(4):310-6.
92. Shiffman RM, Walt JG, Jacobsen G, Doyle JJ, Lebovics G, Sumner W. Utility assessment among patients with dry eye disease. *Ophthalmology* 2003; 110: 1412-9.
93. Tomlinson PhD. Criterios diagnóstico en el síndrome de ojo seco. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2012; 79(6): 259-260.
94. Bron AJ. Diagnosis of dry eye. *Surv Ophthalmol* 2001; 45: 221-6.
95. Hua R, Yao K, Hu Y, Chen L. Discrepancy between subjectively reported symptoms and objectively measured clinical findings in dry eye: a population based analysis. *BMJ Open* 2014;4:e005296. doi:10.1136/bmjopen-2014-005296.
96. Abelson M, Ousler GW, Nally LA, Welch D, Krenzer K. Alternate reference values for tear film breakup time in normal and dry eye populations. *Adv Exp Med Biol* 2002; 506: 1121-5.
97. Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea* 200; 22: 640 - 650.
98. Franck C. Fatty layer of the precorneal film in the «office eye syndrome» *Acta Ophthalmol*. 1991; 69:737-43
99. Egbert PR, Lauber S, Maurice DM. A simple conjunctival biopsy. *Am J Ophthalmol* 1977; 81: 798-801.
100. Murube J, Rivas L. Ojo seco: clasificación clínica y por citología de impresión. *Arch Soc Canar Oftalmol* 2002, nº 13. Comunicación solicitada
101. Sainz de la Maza MT. ¿Es una disfunción de las glándulas de Meibomio? *Stodium Ophthalmologicum*. Nº 3. Vol XXVIII. 2010: ANEXOS.
102. Durán de la Colina JA. Ojo seco hiposecretor. En: *Superficie ocular*. En: *Superficie ocular*. LXXX Ponencia de la Sociedad Española de Oftalmología. 2004. p. 55-64.
103. Xu KP, Yagi Y, Toda I, Tsubota K. Tear function index. A new measure of dry eye. *Arch Ophthalmol* 1995; 113: 84-8.
104. Donate J, Benítez del Castillo JM, Fernández C, García Sánchez J. Validación cuestionario para diagnóstico ojo seco. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2002; 77: 493-500
105. McMonnies CW, Ho A. Responses to a dry eye questionnaire from a normal population. *J Am Optom Assoc* 1987; 58: 588-91.
106. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol* 2000; 118: 615-21
107. Calonge M. The treatment of dry eye. *Survey Ophthalmol*. 2001; 45: 227-239.
108. Córnea. En: Kanski JJ. *Oftalmología clínica*. 6ª Ed. Barcelona: Elsevier; 2009. 245-304.
109. Vico Ruiz E, Benítez del castillo JM. Ojo seco y cirugía refractiva. En: *Superficie ocular*. LXXX Ponencia de la Sociedad Española de Oftalmología. 2004. p. 117-126.
110. Shaheen BS, Bakir M, Jain S. Corneal nerves in health an disease. *Surv Ophthalmol*. 2014; 59(3):263-85.
111. Battat L, Macri A, Dursun D, Pflugfelder SC. Effects on laser in situ keratomileusis on tear production, clearance and the ocular surface. *J Cataract Refract Surg* 2000; 26:337-8.

112. Toda I, Asano-Kato N, Komai-Hori Y, Tsubota K. Dry eye alter laser in situ keratomileusis. *Am J ophthalmol* 2001;132:1-7.
113. Rodríguez Ares T, Benítez del Castillo JM, López Valladares MJ. Lágrimas artificiales. En: *Superficie ocular. LXXX Ponencia de la Sociedad Española de Oftalmología*. 2004. p. 269-272.
114. Ubels JL, McCartney MD, Lantz WK, et al. Effects of preservative-free artificial tear solutions on corneal epithelial structure and function. *Arch Ophthalmol* 1995; 113:371-8.
115. Gobbels M, Spitznas M. Corneal epithelial permeability of dry eyes before and after treatment with artificial tears. *Ophthalmology* 1992; 99:873-8.
116. Ichijima H, Petrol WM, Jester JV, et al. Confocal microscopic studies of living rabbit cornea treated with benzalkonium chloride. *Cornea* 1992; 11:221-5.
117. Versura P, Maltarello M, Stecher F, Caramazza R, Laschi R. Dry eye before and after therapy with hydroxypropylmethylcellulose. *Ophthalmology* 1989; 198: 152-8.
118. Sand B, Marner K, Norm M. Sodium hyaluronate in the treatment of Keratoconjunctivitis sicca. *Acta Ophthalmol* 1989; 67: 181-3.
119. Díaz-Valle D, Benítez del Castillo JM. Antiinflamatorios. En: *Superficie ocular. LXXX Ponencia de la Sociedad Española de Oftalmología*. 2004. p. 281-90.
120. De Paiva CS, Corrales RM, Villarreal AL, Farley W, Li DQ, Stern ME, et al. Apical corneal barrier disruption in experimental murine dry eye is abrogated by methylprednisolone and doxycycline. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 2847-56.
121. De Paiva CS, Corrales RM, Villarreal AL, Farley W, Li DQ, Stern ME, et al. Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye. *Exp Eye Res* 2006; 83: 526-35.
122. Sainz de la Maza Serra SM, Simon Castellvi C, Kabbani O. Esteroides tópicos sin conservantes y oclusión de los puntos lagrimales para la queratoconjunctivitis sicca grave. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2000; 75: 751-6.
123. Pflugfelder S, Solomon A; Stern ME. The Diagnosis and Management of Dry Eye: A Twenty-five-Year Review. *Cornea* 2000; 19(5): 644-649.
124. Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, Smith JA, Gipson IK. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctivallymphocytes. *Arch Ophthalmol* 2000; 118: 1489-96.
125. Kunert KS, Tisdale AS, Gipson IK. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 330-7.
126. Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, et al. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. *Ophthalmology* 2000; 107:631-9.
127. Turner K, Pflugfelder SC, Ji Z, et al. Interleukin-6 levels in the conjunctival epithelium of patients with dry eye disease treated with cyclosporine ophthalmic emulsion. *Cornea* 2000, in press
128. Touriño Peralba R, Rodríguez Ares T. Tratamiento sistémico de las enfermedades de la superficie ocular. En: *Superficie ocular. LXXX Ponencia de la Sociedad Española de Oftalmología*. 2004. p. 319-28.
129. Ta CN, Shine WE, McCulley JP, Prandya A, Trattler W, Norbury JW. Effects of minocycline on the ocular flora of patients with acne rosacea or seborrheic blepharitis. *Cornea* 2003; 22: 545-8.
130. Li DQ, Luo L, Chen Z, Kim HS, Song XJ, Pflugfelder SC. JNK and ERK MAPkinases mediate induction of IL-1 beta, TNF-alpha and IL-8 following hyperosmolar stress in human limbal epithelial cells. *Exp Eye Res* 2006; 82: 588-96.
131. D'Agostino P, Arcoleo F, Barbera C, et al. Tetracycline inhibits the the nitric oxide synthase activity induced by endotoxin cultured murin macrophages. *Eur J Pharmacol* 1998; 346:283-90.
132. Shine WE, McCulley JP, Pandya AG. Minocycline effect on meibomian gland lipids in meibomianitis patients. *Exp Eye Res* 2003;76:417-20.



133. Akpek EK, Lindsley KB, Adyanthaya RS, Swamy R, Baer AN, McDonnell PJ. Treatment of Sjögren's syndrome-associated dry eye: an evidence-based review. *Ophthalmology*. 2011;118(7):1242-52.
134. Ono M, Takamura E, Shinozaki K, Tsumura T, Hamano T, Yagi Y, et al. Therapeutic effect of cevimeline on dry eye in patients with Sjögren syndrome: a randomized, double blind clinical study. *Am J Ophthalmol* 2004; 138: 6-17.
135. Ramos-Casals M, Tzioufas AG, Stone JH, Sisó A, Bosch X. Treatment of primary Sjögren syndrome: a systematic review. *JAMA*. 2010;304(4):452-60.
136. Leung KC, McMillan AS, Wong MC, et al. The efficacy of cevimeline hydrochloride in the treatment of xerostomia in Sjögren's Syndrome in southern Chinese patients: a randomised, double-blind clinical study. *Am J Ophthalmol* 2004;138:6-17.
137. Koh S. Clinical utility of 3% diquafosol ophthalmic solution in the treatment of dry eyes. *Clinical Ophthalmology*. 2015;9:865-872.
138. Kashima T, Itakura H, Akiyama H, Kishi S. Rebamipide ophthalmic suspension for the treatment of dry eye syndrome: a critical appraisal. *Clinical Ophthalmology*. 2014;8:1003-1010.
139. Nebbioso M, Evangelista M, Librando A, Plateroti AM, Pescosolido N. Iatrogenic dry eye disease: an eledoisin/carnitine and osmolyte drops study. *Biomed Pharmacother*. 2013;67(7):659–663.
140. Egrilmez S, Aslan F, Karabuluut G, et al. Clinical efficacy of Smartplug in the treatment of primary Sjögren's Syndrome with keratoconjunctivitis sicca: one-year follow-up study. *Rheumatol Int* 2011;31(12):1567-70.
141. Montero Iruzubieta JM, García Roldán A. Oclusión del punto y del canalículo lagrimal con tapones. En: Murube J. *Técnicas quirúrgicas en el tratamiento del ojo seco*. Ed Glosa. Barcelona. 2007.
142. Drosos AA, Skopouli FN, Costopoulos JS, et al. Cyclosporin (CyA) in primary Sjögren's syndrome: a double blind study. *Ann Rheum Dis* 1986;45:732–5.
143. Drosos AA, Skopouli FN, Galanopoulou VK, et al. Cyclosporin A therapy in patients with primary Sjögren's syndrome: results at one year. *Scand J Rheumatol Suppl* 1986;61:246–9.
144. Fox PC, Datiles M, Atkinson JC, et al. Prednisone and piroxicam for treatment of primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1993;11:149–56.
145. Yavuz S, Asfuroglu E, Bicakcigil M, Toker E. Hydroxychloroquine improves dry eye symptoms of patients with primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol Int* 2011;31(8):1045-9.
146. Meijer JM, Meiners PM, Vissink A, et al. Effectiveness of rituximab treatment in primary Sjögren's syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2010;62:960–8.
147. Pijpe J, van Imhoff GW, Spijkervet FK, et al. Rituximab treatment in patients with primary Sjögren's syndrome: an open-label phase II study. *Arthritis Rheum* 2005;52:2740–50.
148. Steinfeld SD, Demols P, Appelboom T. Infliximab in primary Sjögren's syndrome: one-year follow up. *Arthritis Rheum* 2002;46:3301–3.
149. Sankar V, Brennan MT, Kok MR, et al. Etanercept in Sjögren syndrome: a twelve-week randomized, double-blind, placebo-controlled pilot clinical trial. *Arthritis Rheum* 2004;50:2240–5.
150. Ter Borg EJ, Haanen HC, Haas FJ, et al. Treatment of primary Sjögren's syndrome with D-penicillamine: a pilot study. *Neth J Med* 2002;60:402–6.
151. Willeke P, Schlüter B, Becker H, et al. Mycophenolatesodium treatment in patients with primary Sjögren syndrome: a pilot trial. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R115.
152. Ferraccioli GF, Salaffi F, De Vita S, et al. Interferon alpha-2 (IFN alpha 2) increases lacrimal and salivary function in Sjögren's syndrome patients: preliminary results of an open pilot trial versus OH-chloroquine. *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14:367–71.
153. López García JS, García Lozano I, Elosua de Juan I, Sánchez-Carnero F. Suero autólogo: Introducción y propiedades. En: López García JS, Murube del Casrtillo J. Suero

autólogo y derivados hemáticos en oftalmología. Comunicación solicitada. 87 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Oviedo. 2011.

154. Jester JV, Huang J, Petroll WH, et al. TGF beta induced myofibroblast differentiation of Rabbit keratocyt requires synergistic TGF beta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res.* 2002; 72:645-57.

155. Jester Job-Chang J. Modulation of cultured corneal keratocyte phenotype by growth factors/citokynes control in vivo contractility and extracellular matrix contraction. *Exp Eye Res.* 2003;77:581-92.

156. Kruse FE, Tseng SC. Serum differentially modulates the clonal growth and differentiation of cultured limbal and corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34:2976-89.

157. Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 2004; 88: 1467-1474.

158. Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, et al. Treatment of dry eye by autologous serum aplicattion in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 390-395.

159. Harloff S, Hartwig D, Kasper K, et al. Epitheliotropic capacity of serum eye drops from healthy donors versus serum from immunosuppressed patients with rheumatoid arthritis. *Klin Monbl Augenheildk.* 2008;225:200-6.

160. Nisihida T. The cornea: statics and dynamics. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 2008; 112:179-212.

161. López García JS, Rivas Jara L, Castro Rebollo M, Garcia Lozano I. Suero autólogo: efectos biológicos. En: López García JS, Murube del Casrtillo J. Suero autólogo y derivados hemáticos en oftalmología. Comunicación solicitada. 87 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Oviedo. 2011.

162. Poon AC, Geerling G, Dart JK, Fraenkel GE, Daniels JT. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1188-97.

163. Argüeso P, Balaram M, Spurr-Michaud S, et al. Decreased leve of the goblet cell mucin MUC5AC in terso f patients with Sjögres syndrome, Ivest *Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 1004-11.

164. Kojima T, Ishida R, Dogru M, et al. The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: a prospective randomized case-control study. *Am J Ophthalmol.* 2005; 139:242-6.

165. López Abad C, Méndez Fernández R, Cuiña Sardiña R, Díaz Valle D, Muñoz Hernández AM, Ariola Villalobos P, Iradier Urrutia MT, Benítez del castillo JM. Indicaciones del suero autólogo en superficie ocular (I). En: López García JS, Murube del Castillo J. Suero autólogo y derivados hemáticos en oftalmología. Comunicación solicitada. 87 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Oviedo. 2011.

166. López García JS, García-Lozano I, Rivas L, et al. Aplicaciones del suero autólogo en oftalmología. *Arch Soc Oftalmol* 2007; 82:9-20.

167. Balado Vázquez P, Cortés Valdés C, Guadilla Borrás A, García-Valcárcel B, Acero A. Indicaciones del suero autólogo en superficie ocular (II). En: López García JS, Murube del Castillo J. Suero autólogo y derivados hemáticos en oftalmología. Comunicación solicitada. 87 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología. Oviedo. 2011.

168. Hyon JY, Lee YJ, Yun PY. Management of ocular surface inflammation in Sjögren syndrome. *Córnea.* 2007; 26(Supl 1): S113-15.

169. Méndez Fernández R, Benítez del Castillo JM. Suero autólogo. En: Superficie ocular. LXXX Ponencia de la Sociedad Española de Oftalmología. 2004.

170. McDonnell PJ, Schanzlin DJ, Rao NA. Immunoglobulin deposition in the cornea alter application of autologous serum. *Arch Ophthalmol* 1988; 106: 1423-5.

171. Voak D, Cann R, Finney RD, Fraser ID, Mitchell R, Murphy MF, et al. Guidelines for administration of blood products: transfusion of infants and neonates. *British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force. Transfus Med* 1994; 4: 63-69.

172. Yoon KC, You IC, Heo H, Im SY, Jeong TS, Park YG, Choi J. Application of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of neurotrophic keratitis. *Ophthalmology*. 2007;114:1637-42.
173. Yoon KC. Use of Umbilical Cord Serum in Ophthalmology. *Chonnam Medical Journal*. 2014;50(3):82-85.
174. Yoon KC, Heo H, Im SY, You IC, Kim YH, Park YG. Comparison of autologous serum and umbilical cord serum eye drops for dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol*. 2007; 144:86-92.
175. Versura P, Profazio V, Buzzi M, Stancari A, Arpinati M, Malavolta N, et al. Efficacy of standardized and quality-controlled cord blood serum eye drop therapy in the healing of severe corneal epithelial damage in dry eye. *Cornea*. 2013;32:412-418.
176. Boto de los Bueis A, Del Hierro Zarzuelo A, Pastora Salvador N, Corral Aragón A, Hernández González C, Fonseca Sandomingo A. Sueros heterólogos: Suero alogénico, suero de cordón umbilical y colirio de membrana amniótica. En: López García et al. Suero autólogo y derivados hemáticos en oftalmología. Comunicación solicitada 87 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología.
177. López-Plandolit S, Morales C, Durán JA, et al. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). En: López García et al. Suero autólogo y derivados hemáticos en oftalmología. Comunicación solicitada 87 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología.
178. Alió JL, Abad M, Artola A, Rodríguez Prats JL, Pastor S, Ruiz-Colecha J. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. *Ophthalmology* 2007; 114 (7): 1286-1293.
179. López-Plandolit S, Morales C, Durán JA, et al. Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) as a therapeutic agent for severe persistent corneal epithelial defects. *Cornea* 2010; 29: 843-8.
180. Douglas C. Montgomery. *Design and Analysis of Experiments*, 5th Edition. John Wiley & Sons. 2001.
181. Han S, Hyon J, Woo S, Lee J, Kim T, Kim K. Prevalence of Dry Eye Disease in an Elderly Korean Population. *Arch Ophthalmol*. 2011;129(5):633-638.
182. Shen EP, Hu FR, Lo SC, Chen YM, Sun YC, Lin CT, Chen WL. Comparison of corneal epitheliotropic capacity among different human blood-derived preparations. *Cornea*. 2011 Feb;30(2):208-14.
183. Coghill JM, Sarantopoulos S, Moran TP, et al. Effector CD4+ T cells, the cytokines they generate, and GVHD: something old and something new. *Blood*. 2011;117:3268-3276.
184. Baturone R, Soto MJ, Márquez M, et al. Health-related quality of life in patients with primary Sjögren's syndrome: relationship with serum levels of proinflammatory cytokines. *Scand J Rheumatol*. 2009;38:386-389.
186. Harloff S, Hartwig D, Kasper K, Wedel T, Müller M, Geerling G. Epitheliotropic capacity of serum eye drops from healthy donors versus serum from immunosuppressed patients with rheumatoid arthritis. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2008 Mar;225(3):200-6.
187. Versura P, Buzzi M, Giannaccare G, Fresina M, Velati C, Campos EC. Targeting growth factor supply in keratopathy treatment: comparison between maternal peripheral blood and cord blood as sources for the preparation of topical eye drops. *Blood Transfus* 2015;9:1-7.
188. Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Geerling G. An optimised protocol for the production of autologous serum eyedrops. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005; 243: 706-714.
189. Savini G, Prabhawasat P, Kojima T, Grueterich M, Espana E, Goto E. The challenge of dry eye diagnosis. *Clinical ophthalmology* (Auckland, NZ). 2008;2(1):31-55.
190. Foulks, GN. Challenges and pitfalls in clinical trials of treatments for dry eye. *The Ocular Surface*. 2003; 1: 20-30.
191. Yokoi, N., & Komuro, A. Non-invasive methods of assessing the tear film. *Experimental eye research*. 2004; 78(3): 399-407.

# Anexo



# Anexo: Consentimiento informado del estudio

## FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO

Orden de 8 de julio de 2009 (BOJA no 152 de fecha 6 de agosto) por la que se dictan instrucciones a los Centros del Sistema Sanitario Público de Andalucía, en relación al procedimiento de Consentimiento Informado.

<b>CENTRO SANITARIO</b>	<b>SERVICIO DE OFTALMOLOGIA .BANCO DE TEJIDOS</b>
<b>HOSPITAL REGIONAL CARLOS HAYA</b>	<b>DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA (*) COLIRIO BIOLÓGICO PARA EL ENSAYO CLINICO: Ensayo Clínico aleatorizado, doble ciego, de grupos paralelos y unicéntrico comparando el efecto del Suero Autólogo, Heterólogo de donante de Sangre Periférica y de Sangre del Cordón Umbilical en el tratamiento del ojo seco</b>

Este documento sirve para que usted, o quien lo represente, dé su consentimiento para esta intervención. Eso significa que nos autoriza a realizarla.

Puede usted retirar este consentimiento cuando lo desee. Firmarlo no le obliga a usted a hacerse la intervención. De su rechazo no se derivará ninguna consecuencia adversa respecto a la calidad del resto de la atención recibida. Antes de firmar, es importante que lea despacio la información siguiente.

Díganos si tiene alguna duda o necesita más información. Le atenderemos con mucho gusto.

(\*) Indicar el nombre del procedimiento/intervención a realizar; si es posible, además del nombre técnico que siempre debe figurar, puede tratar de expresarlo con un nombre más sencillo.

### 1.1 LO QUE USTED DEBE SABER:

#### EN QUÉ CONSISTE. PARA QUÉ SIRVE:

Por su patología oftalmológica, solo queda la alternativa terapéutica de utilizar un colirio biológico. Esto es prepararle unas gotas con la parte líquida de la sangre, suero o plasma, para mantener la humedad del ojo, así como proporcionarle factores cicatrizantes. Este colirio procede de la sangre después de una preparación en el laboratorio.

Usted va a formar parte de un ensayo clínico donde se le va a administrar un colirio preparado o bien de su propia sangre o de un donante de sangre o de una donante de sangre de cordón umbilical.

Ni usted ni su oftalmólogo sabrán el origen del mismo, para así valorar de forma objetiva los resultados clínicos que se produzcan

#### CÓMO SE REALIZA:

Con el suero o plasma previamente analizado se preparará un vial sobre una solución salina tamponada lista para su uso

Se le dará uno ó mas viales dependiendo de la indicación clínica y de la disponibilidad en el banco de donantes analizados.

#### QUÉ EFECTOS LE PRODUCIRÁ:

La evidencia científica del momento demuestra su eficacia , en casos como el suyo, si bien no es una práctica muy extendida, pero si esta plenamente indicada en su caso concreto

**EN QUÉ LE BENEFICIARÁ:**

En la mejoría de los síntomas y en la cicatrización de su proceso

**OTRAS ALTERNATIVAS DISPONIBLES EN SU CASO:**

**QUÉ RIESGOS TIENE:**

Cualquier actuación médica tiene riesgos. La mayor parte de las veces los riesgos no se materializan, y la intervención no produce daños o efectos secundarios indeseables. Pero a veces no es así. Por eso es importante que usted conozca los riesgos que pueden aparecer en este proceso o intervención.

• **LOS MÁS FRECUENTES: COLIRIO:**

-Como otro colirio habitual, reacciones de tipo local: escozor, picor enrojecimiento •

**LOS MÁS GRAVES:**

**COLIRIO:**

-Al ser un producto biológico sin conservantes, puede producirse una contaminación microbiana en raros casos y ocasionar un proceso infeccioso de tipo local en el lugar de la aplicación .

-Como producto biológico no esta exento de transmisión de agentes infecciosos a pesar de estar debidamente analizado.

• **LOS DERIVADOS DE SUS PROBLEMAS DE SALUD:**

**SITUACIONES ESPECIALES QUE DEBEN SER TENIDAS EN CUENTA:**

Si su oftalmólogo indica mas tiempo de tratamiento debe ponerse en contacto con el banco de tejidos antes de terminar el vial para la preparación programada de otro nuevo, con objeto de no quedarse sin gotas.

**OTRAS INFORMACIONES DE INTERÉS (a considerar por el/la profesional):**

Se le realizara previamente un control analítico para HIV, hepatitis B, hepatitis C y sífilis, del cual será debidamente informado de los resultados.

Se le realizaran visitas por su oftalmólogo para verificar la evolución y eficacia del tratamiento empleado

Se le entregará un cuestionario de autoevaluación que deberá rellenar antes y despues del tratamiento, para que usted exprese la intensidad de los síntomas y la posible mejoría de los mismos.

Finalmente en cumplimiento de la Ley de protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre) ponemos en su conocimiento que la información obtenida en la asistencia sanitaria a su persona ha sido incorporada para su tratamiento a un fichero automatizado. Así mismo se le informa que la recogida y tratamiento de dichos datos tienen como finalidad, el estudio epidemiológico, científico y docente, respetando en todo momento su anonimato. Si lo desea, puede ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, previstos por la ley. .

**OTRAS CUESTIONES PARA LAS QUE LE PEDIMOS SU**

**CONSENTIMIENTO:**

- A veces, durante la intervención, se producen hallazgos imprevistos. Pueden obligar a tener que modificar la forma de hacer la intervención y utilizar variantes de la misma no contempladas inicialmente.

- A veces es necesario tomar muestras biológicas para estudiar mejor su caso. Pueden ser conservadas y utilizadas posteriormente para realizar investigaciones relacionadas con la enfermedad que usted padece. No se usaran directamente para fines comerciales. Si fueran a ser utilizadas para otros fines distintos se le pediría posteriormente el consentimiento expreso para ello. Si no da su consentimiento para ser utilizadas en investigación, las muestras se destruirán una vez dejen de ser útiles para documentar su caso, según las normas del centro. En cualquier caso, se protegerá adecuadamente la confidencialidad en todo momento.

- También puede hacer falta tomar imágenes, como fotos o videos. Sirven para documentar mejor el caso. También pueden usarse para fines docentes de difusión del conocimiento científico. En cualquier caso serán usadas si usted da su autorización. Su identidad siempre será preservada de forma confidencial.

1.2	<b>IMÁGENES EXPLICATIVAS</b>
En este espacio podrán insertarse con carácter opcional imágenes explicativas, esquemas anatómicos, pictogramas etc. que faciliten y permitan explicar de manera más sencilla la información al paciente.	

2.1	<b>DATOS DEL/DE LA PACIENTE Y DE SU REPRESENTANTE</b> (sólo en caso de incapacidad del/de la paciente)	
APELLIDOS Y NOMBRE, DEL PACIENTE		DNI / NIE
APELLIDOS Y NOMBRE, DEL/DE LA REPRESENTANTE LEGAL		DNI / NIE
2.2	<b>PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO</b>	
APELLIDOS Y NOMBRE	FECHA	FIRMA
APELLIDOS Y NOMBRE	FECHA	FIRMA
APELLIDOS Y NOMBRE	FECHA	FIRMA
APELLIDOS Y NOMBRE	FECHA	FIRMA
APELLIDOS Y NOMBRE	FECHA	FIRMA
2.3	<b>CONSENTIMIENTO</b>	
<p>Yo, D/Dña</p> <p>, manifiesto que estoy conforme con la intervención que se me ha propuesto. He leído y comprendido la información anterior. He podido preguntar y aclarar todas mis dudas. Por eso he tomado consciente y libremente la decisión de autorizarla. También sé que puedo retirar mi consentimiento cuando lo estime oportuno.</p> <p>SI NO Autorizo a que se realicen las actuaciones oportunas, incluyendo modificaciones en la forma de realizar la intervención, para evitar los peligros o daños potenciales para la vida o la salud, que pudieran surgir en el curso de la intervención.</p> <p>SI NO Autorizo la conservación y utilización posterior de mis muestras biológicas para investigación relacionada directamente con la enfermedad que padezco.</p> <p>SI NO Autorizo que, en caso de que mis muestras biológicas vayan a ser utilizadas en otras investigaciones diferentes, los investigadores se pongan en contacto conmigo para solicitarme consentimiento.</p> <p>SI NO Autorizo la utilización de imágenes con fines docentes o de difusión del conocimiento científico.</p>		

NOTA: Márquese con una cruz.	
En ade de EL/LA PACIENTE EL/LA REPRESENTANTE LEGAL (sólo en caso de incapacidad del paciente) Fdo.: Fdo.:	
2.4	RECHAZO DE LA INTERVENCIÓN
Yo, D/Dña. , no autorizo a la realización de esta intervención. Asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida. En EL/LA PACIENTE Fdo.: a de de EL/LA REPRESENTANTE LEGAL (sólo en caso de incapacidad del paciente) Fdo.:	
2.5	REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO
Yo, D/Dña , de forma libre y consciente he decidido retirar el consentimiento para esta intervención. Asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida. En a de de EL/LA PACIENTE EL/LA REPRESENTANTE LEGAL (sólo en caso de incapacidad del paciente) Fdo.: Fdo.:	

Resumen en inglés –  
*English summary*

# Resumen en inglés –

## *English summary*

### *Abstract*

*The dry eye syndrome (DES) is a group of ocular illnesses that have in common the ocular discomfort and the diminished tear secretion or the abnormal evaporation of the tear film.*

*The DES is a multifactorial, frequent condition: depending on the series, 8 to 33% of the population is affected. The signs and symptoms can vary greatly, from occasional pain and redness to severe conditions of the ocular surface. Despite of the multiple treatments available, a high percentage of patients do not show improvement or show sequelae.*

*The autolous serum (AS) eye drops are prepared from the patient's own blood. It has showed to be useful in refractory DES and other conditions of the ocular surface. However, there are some patients with severe DES that are not candidates for blood extraction, because of their physical condition, contagious illnesses or lack of collaborative attitude. Apart from avoiding the periodical blood extraction needed for AS treatment, promising results have been published regarding the use of umbilical cord serum (UCS) eye drops, that may have a higher percentage of growing factors than the AS.*

*With this clinical trial we intend to compare the clinical effects of the AS and the UCS eye drops and quantify the growing factors, vitamins and other essential molecules for the ocular surface homeostasis, in order to explore new therapies for the DES.*

## Discussion

### a) Demographic data

*In the present study 64 eyes of 32 caucasian patients with moderate to severe dry eye syndrome (DES) where recruited and randomized. The scope of the present work is to assess the effect of autologous serum eye drops (AS) versus umbilical cord serum (UCS) eye drops at one and three months, measuring the following ocular surface test: Schirmer test, BUT, fluorescein staining, lissamine green staining and a questionnaire (104).*

*Yoon (174) compared 92 eyes of 48 patients with moderate to severe DES. 41 eyes of 21 patients were assigned to the AS Group and 51 eyes of 27 patients to the UCS group. Schirmer test, BUT, fluorescein staining, tear clearance, corneal esthesiometry and a questionnaire where performed, at one and two months after the beginning of the treatment. Versura (175) applied UCBS in 59 eyes 30 patients, 33 with GVHD and 26 with Sjögren syndrome with a grade 4 or more in the Oxford scale. Schirmer test, BUT, fluorescein staining, corneal esthesiometry and symptoms, satisfaction and tolerability tests were performed before and one month after starting the treatment.*

*Most of the patients of our study were females: 56 patients (86%), with a feminine/masculine ratio for the AS group of 32:0, and a 24:8 (3:1) ratio for the UCS group. The mean age of the patients of the present study was 61.5 years (range 44 - 88). The mean age in the AS group was 56 years (range 45.9 - 64) and 62 years (range 57.75 – 69.25) in the UCS group. This difference was statistically significant ( $p = 0,010$ ).*

*Yoon (174) provides a more homogeneous group, with a feminine/masculine ratio of 11:10 for the AS group and a 15:12 ratio for the SCU Group. Besides, the population in his work is also younger, the mean age was 39.95 years (range 20 - 59) and 41.96 years (range 20 – 61) in the AS group and in the UCS group, respectively. Versura (174) reported 59 eyes, 19 were female patients and 11 man patients. The Sjögren syndrome group was constituted only by female patients with*

*a mean age of  $59.6 \pm 13.1$  years. El GVHD group had a higher proportion of male patients (11 versus 6 female patients) and lower mean age:  $38.8 \pm 5.8$  years.*

*DES affects mainly post-menopausal woman, elderly patients and patients with autoimmune diseases (66-71). While the subgroup with auto-immune diseases of Versura (175) and the patients of our study coherent with the described epidemiology of DES, The demographic sample of Yoon's article (174) is not (66-71), even when considering the Korean population, where he performed the study (181).*

### *b) Response to the treatment*

*When analysing the clinical response to AS and UCS eye drops, measured by the changes in Schirmer test (mm), BUT (seconds), fluorescein staining of the ocular surface (according to Oxford scale), lissamine green staining of the corneo-conjunctival epithelium (according to the van Bijsterveld scale) and the questionnaire of Donate (104), we found statistically significant changes in all the tests. Thus, both treatments significantly improved the condition of the ocular surface after three months of treatment.*

*The effects of AS eye drops for DES are well-known. Almost all authors have found a subjective improvement of the ocular surface as soon as 48 after starting the treatment (23,165,166): Tsubota (158) and Poon (162) described an improvement in the fluorescein staining (165) and Schirmer test. Other authors did not find changes in the Schirmer test with the AS (5,23,158). Kojima (164) reported an improvement in the BUT of patients treated with AS compared to conventional artificial tears.*

*Yoon (174) and Versura (175) have reported the outcomes of UCS eye drops treatment for DES. Yoon (174) found an improvement in the questionnaire, BUT and fluorescein staining, both with AS and UCS eye drops after one and two months of treatment. Versura (175) reported positive changes in Schirmer test, BUT, osmolarity, squamous metaplasia and questionnaire as soon as one month after the treatment.*



### *c) Comparison between AS and UCS eye drops*

*The results from the present study show that UCS eye drops are not inferior to AS eye drops for the treatment of DES:*

- When comparing the outcomes of both treatments for the Schirmer test, BUT and fluorescein staining, no statistically significant differences were found.*
- Statistically significant differences were found in the lissamine green staining, wich showed slightly better results in the SA group. However, given that the values were already better in the first appointment (previous to treatment), it does not seems like a relevant outcome.*
- When comparing the results from the third follow-up to the first one for all the tests performed, including the questionnaire, there were no statistically significant differences between both treatments.*

*Yoon (174) reported that eyes treated with both AS and UCS eye drops showed improvement in symptoms, BUT, corneal staining and cytology (in AS, only in patients without Sjögren syndrome). Shen (182) showed that UCBS was superior to AS regarding epithelial cells proliferation and differentiation.*

### *d) Patients with previous treatment*

*There were 12 eyes (38%) in the AS group and 8 eyes (25%) in the UCS group that used previous treatment with AS an fulfilled the inclusion criteria of our study, all of them women with autoimmune disease. After a whasout period of four weeks using artificial tears and ointments, they were enrolled in the study.*

*There were not statistically significant differences between the patients that have previously used treatment with AS and where assigned to the AS group and those assigned to the UCS treatment. Surprinsingly, the only statistically significant value ( $p = 0.046$ ) was the scoring of the questionnaire in the third appointment, which was inferior (thus, better) in those patients assigned to the AS group that previously used AS. This maybe caused by the Hawthorne effect, also known as the observer effect.*

### *e) Patients with autoimmune disease*

*In our study 67% of the patients showed previous autoimmune disease, 86% of them were female patients. These figures are coherent with the works published by other authors (67), that also find that patients with autoimmune diseases show more often signs and symptoms of DES, and are generally female patients (78%). The most prevalent illnesses in our study were primary Sjögren syndrome (18 eyes, 9 patients) and rheumatoid arthritis (18 eyes, 9 patients). Yoon (174), however, reported a 37% of patients with Sjögren syndrome (the only autoimmune disease he included in his study), of which 77% were women.*

*DES in Sjögren syndrome is often severe and refractory to treatment because the lagrimal secretion is greatly impaired (167). Tsubota (158) argues that AS is the preferred therapy in these patients, due to the similar biochemical characteristics of AS compared to the tear fluid, for being hypoallergenic and for containing growth factors and other necessary molecules for the ocular surface homeostasis. Noble (23) and Kojima (157) in their prospective and randomized studies treating Sjögren syndrome patients with AS, only found improvement in the conjunctival cytology and symptom scoring.*

*Before starting this study, we had a concern about using AS in patients with autoimmune diseases, given that the concentration of growing factors is lower in the serum of these patients (174,175,183-186). Nonetheless, the statistical analysis performed in the present work did not show differences between patients with autoimmune diseases assigned to SA group and those that were treated with UCS eye drops. The only statistically significant value was the difference in the age of patients ( $p = 0.003$ ).*

*On the other hand, Yoon (174), found that UCS eye drops were more effective than AS eye drops in the treatment of Sjögren syndrome, regarding symptom scoring, corneal staining and conjunctival cytology. Versura (175) included graft-versus-host-disease and Sjögren syndrome patients with severe persistent corneal defects. After one month of treatment with UCS, BUT, Schirmer test, tear osmolarity, corneal esthesiometry, conjunctival epithelial metaplasia and the scoring of the questionnaire improved significantly.*

#### *f) Concentration of molecules*

*There was a significant difference in the values of all the molecules in favor of the AS: albumin (g/dl), fibronectine ( $\mu\text{g/ml}$ ), IgA (mg/dl), IgG (mg/dl), IgM (mg/dl), vitamine A ( $\mu\text{g/dl}$ ), vitamine E ( $\mu\text{g/dl}$ ), EGF (ng/dl) and TGF (ng/dl).*

*However, the previous work in which the present study was based (174) and posterior articles (175,187,188), reported that the concentration of growth factors is higher in UCS than in peripheral blood serum (AS in our study), except for vitamine A.*

*Specifically, Yoon and Versura (28,173-175,184) found:*

*a) Concentration of molecules that were higher in UCS than AS:*

- EFG and TGF $\beta$ , three times and twice higher, respectively.*
- Other growth factors not included in this study: NGF y VEGF.*
- P substance.*

*b) Concentration of molecules that were lower in UCS than AS:*

- IGF (not included in this study).*
- Vitamine A. Even with the lower concentration in UCS than AS, it was still higher than the concentration in tears and enough to prevent squamous metaplasia.*

*The Centro Regional de Transfusión Sanguínea of Málaga owns the bigger Cord Blood Bank in Europe in terms of stored units. We do not believe that there were mistakes in the technique of preparation of the serum eye drops, because in the AS eye drops we obtain similar values to those reported by other authors (157,161,174,175,187).*

*When comparing the mean values of the molecules of the AS eye drops samples with those reported by Geerling (157), they were equivalent, except for the vitamine A, whose concentrations were higher in our samples (table 7).*

	<i>Our study</i>	<i>Geerling (157)</i>
<b>EGF (ng/ml)</b>	0.81	0.5
<b>TGF-<math>\beta</math> (ng/ml)</b>	21.10 ( $\pm 5.66$ )	6-33
<b>Vitamina A (mg/ml)</b>	42.60 ( $\pm 15.37$ )	46
<b>IgA (mg/dl)</b>	344.46 ( $\pm 232.92$ )	2
<b>Fibronectina (<math>\mu</math>g/ml)</b>	255 ( $\pm 185.30$ )	205

Table 7. Comparison of the values of various molecules in the AS eye drops of our samples and Geerling's (157).

Unexpectedly, the concentrations of the molecules in the UCS eye drops samples were inferior to those in AS, in contradiction to the results published by other authors (28,173-175,184), except for the vitamine A which was reported to be lower in UCS. This fact may be caused by various reasons:

- It is important to take into account that the determinations reported in the articles mentioned, are calculated directly in serum samples. We have used the determinations in plasm, that is diluted in anticoagulant (20 ml of anticoagulant solution for every 60 ml of plasm, approximately). Performing the calculations the following concentrations would result:
  - For the EGF, it would pass from an average of 0.13 ng/dl in our calculations in plasm to 0.20 ng/ml converted to the serum concentration. Versura (175,184) reports a range of 0.2-3 ng/ml, thus, our average concentration would fall in the inferior range of concentration.
  - For the TGF, even making the conversion from plasm (3.04 ng/ml) to serum (4.56 ng/ml) concentrations, the values are clearly lower to those reported by other authors (175), 30-51 ng/ml.
- The time ellapsed between obtaining the cord blood sample and processing it to prepare the UCS, could have influenced the concentration of TGF. Liu (188) reports that coagulation time can augment the concentration of EGF and diminish the levels of TGF, although he only studied the effect up to 120 minutes. In our study the

*maximun time ellapsed between the extraction of the umbilical cord blood and its processing is 24 hours. Other authors (174,175) prepare the UCS eye drops in a similar fashion to AS eye drops, centrifuging the sample after two hours of storing it at room temperature. If TGF diminishes constantly until the blood is processed, that could be an explanation for the low concentrations in the UCS eye drops we obtained.*

*g) Particularities of the UCS processing in our centre*

*a. Processing of the UCS samples*

*The UCS eye drops for the present study were prepared from those samples that were no valid for the transplant of hemopoietic progenitors. In all cases, the time ellapsed between the blood extraction and the preparation of the eye drops was less than 24 hours, but this period is certainly higher than the time reported by other authors (174,184). This larger amount of time between extraction of the umbilical cord blood and preparation of UCS eye drops may have caused the decrease in molecules in UCS eye drops we found in our study compared to other authors (28,173-175,184). The work of Liu (188) seems to support this hypothesis.*

*To assess this issue we intend to perform a study regarding the stability of the molecules in the UCS eye drops depending on the time ellapsed between extraction of the umbilical cord blood and preparation of teh eye drops, i.e., if shorter periods of time between extraction and preparation yield higher proportions of molecules in the UCS eye drops.*

*b. Effectiveness of the UCS eye drops*

*The procedure of obtaining the UCS eye drops was complicated. From the 34 umbilical cord blood samples there was a 50% (17 samples) of severe hemolysis after centrifugation. From the remaining 17 valid samples only 13 could be finally used, because three samples (17.6%) showed bacterial contamination.*

*However, the UCS eye drops procedure showed a good effectiveness: from a single donation, an average of 15 vials were obtained. In total, from the 14 valid donations, 211 vials of UCS eye drops were obtained.*

*The main advantage of UCS eye drops compared to other heterologous eye drops is that for preparing the UCS eye drops the discarded blood from samples that are no valid for the transplant of hemopoietic progenitors are used. Besides, UCS does not contain agglutinins, and thus is not antigenic. However, for preparing a regular heterologous serum eye drops, the blood comes from the regular donations, and must be always from the AB group to avoid antigenicity. Blood nowadays is scarce and can be used in other multiple procedures and interventions.*

#### *h) Limitations of the study*

##### *a. Sample size calculation*

*We would like to emphasize the difficulty of recruiting the necessary number of patients for the current study. From December, 2012 to May, 2015, almost 500 patients have been evaluated, all of them referred by ophthalmologists because of dry eye symptoms that did not improved with conventional therapy. Finally, 96 eyes of 48 patients were included in the clinical trial: three groups of 32 eyes of 16 patients treated treated with AS, UCS and heterologous serum (HS). For the present work, only the data of the AS and UCS groups were included. The total sample size of the clinical trial, including HS, was similar to that reported by Yoon (174), that included 92 eyes of 48 patients with moderate to severe DES.*

##### *b. Patient enrollment*

*A very low rate of the studied patients fulfilled the inclusion criteria for the study, except for the patients with autoimmune diseases. Among the patients that metted the criteria, a percentage neglected to participate because of the rejection to use serum from other donors (heterologous / umbilical cord blood), while other manifested their impossibility to*

*attend the periodical appointments for blood extraction and ophthalmologic follow-ups.*

*Regarding the patients that abandoned the study, 14 eyes of 7 patients signed the informed consent and underwent the first ophthalmologic follow-up, but did not complete it. Though, all patients that had the blood extraction performed, completed the study. No patient abandoned the trial between the second and third ophthalmologic follow-up.*

*c. Control group absence*

*We have not considered to include a control group in our study because from the ethical point of view there is a minimal, but possible chance of acquiring an infectious disease with the heterologous eye drops. Besides, the control group should have undergone periodical blood extractions during the three months of the study, fact that we find most inconvenient.*

*d. Biases*

*- Bias of selection.*

*c) Auto-selection.*

*The decision to participate in the clinical trial is voluntary, up to the patient.*

*d) Lost follow-ups.*

*Patients that voluntarily abandon the study may show some adverse effects related to the treatment that can not be assessed.*

*- Bias of measurement.*

*The regular, non-automated, available tests to explore the DES show a certain intrinsic intra and inter observer variability that may affect the precision of the measurements.*

*- The observer effect bias (Hawthorne effect).*

*The patients included in a clinical trial tend to modify or improve their compliance and behavior in response to their awareness of being observed.*



e. Performed tests

*For the present work we have chosen as ophthalmologic tests: Schirmer test, BUT, fluorescein staining, lissamine green staining and a questionnaire. These tests are widely accepted, regularly included in clinical studies and performed by ophthalmologists worldwide. We also performed a conjunctival impression cytology of every patient in all the visits, but unfortunately due to logistic reasons and problems with the storage of the samples, most of them were damaged and could not be analyzed.*

*Unfortunately, more advanced techniques and devices as an osmometer, meibometry, meniscography, rate of tear clearance, esthesiometry, termography, confocal microscopy and the objective assessment of the blinking time are not available in our centre. On the other hand, it could have been interesting to perform a corneal topography and to analyse the concentration of the molecules in the tear fluid.*

*However, various authors (189-191) and specially the Report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye Workshops (2007), both in “Methodologies to Diagnose and Monitor Dry Eye Disease” and in “Design and Conduct of Clinical Trials” sections, emphasize that no test can be chosen as a Gold Standard for the DES diagnosis and no variable may be taken as definitive (24).*



## Conclusions

*After analyzing the data of the present study, we have arrived to the following conclusions:*

1. *Both AS and UCS eye drops are effective for the treatment of the dry eye.*

*Schirmer test, BUT, fluorescein staining, lissamine green staining and questionnaire scores improved during the three months of the study both with AS and UCS eye drops.*

2. *UCS is not inferior to AS in the treatment of the dry eye.*

*There have not been statistically significant differences between AS and UCS for the Schirmer test, BUT, fluorescein staining and the questionnaire scores at one and three months after starting the treatment. There has been, however, a statistically significant difference in the lissamine green staining in favour of SA.*

3. *UCS do not contain a higher concentration of molecules compared to AS.*

*In the current study we have been found a lower concentration of albumin, fibronectine, IgA, IgG, IgA, vitamine A, vitamine E, EGF and TGF in the UCS eye drops compared to the AS eye drops. This may have been caused because of the longer storage time before the preparation of the UCS eye drops compared to the AS eye drops.*

4. *The procedure of obtaining the UCS eye drops is complicated.*

*There was a 50% of hemolysis in the umbilical cord blood samples, so it was necessary to process a high number of samples in order to optimize the preparation of the UCS eye drops.*

5. *UCS eye drops show some advantages compared to AS eye drops.*
- a) Various vials can be obtained from a single donor (15 on average).*
  - b) It can be prepared and stored safely in advance, so it can be administered immediatly in case of an urgent condition of the ocular surface.*
  - c) It is not necessary to perform the blood extraction to the patient. The eye drops are prepared from those samples that are no valid for the transplant of hemopoietic progenitors. Thus, UCS eye drops are an excellent option in those patients not suitable for periodic blood extraction.*